



SECRETARIA

DE

EDUCACION PUBLICA

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO



CICIMAR

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

CIENCIAS MARINAS

**" PURIFICACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DE LA
PROFENOLOXIDASA DE HEMOCITOS DE CAMARONCAFE
(*Penaeus californiensis*) "**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

Teresa Gollas Galván

Contenido

| | |
|--|----|
| Contenido | 1 |
| Lista de Tablas y Figuras | 3 |
| Abreviaturas | 4 |
| Glosario | 5 |
| Resumen.. | 6 |
| Abstract | 7 |
| Introducción | 8 |
| Antecedentes | 12 |
| Justificación | 17 |
| Objetivos.. | 18 |
| Materiales y Métodos.. | 19 |
| Organismos | 19 |
| Reactivos | 19 |
| Obtención de la hemolinfa | 19 |
| Obtención de hemocitos | 20 |
| Obtención de proFO a partir de lisado de hemocitos | 20 |
| Obtención de proFO por centrifugación..... | 20 |
| Determinación de actividad FO.. | 20 |
| Detección de profenoloxidasa.. | 21 |
| Purificación de la proFO | 21 |
| Determinación de proteínas..... | 22 |
| Electroforesis | 22 |
| Revelado de los geles de electroforesis | 23 |
| Determinación de la masa molecular.. | 23 |
| Punto isoeiétrico (pI) | 24 |
| Efecto de la temperatura sobre la proFO y FO.. | 24 |
| Inhibidores | 24 |
| Determinación de la Km y la velocidad máxima.. | 25 |
| Resultados.. | 27 |
| Efecto de la melitina.. | 28 |
| Participación del calcio en la activación del sistema proFO | 30 |
| Activación por compuestos químicos.. | 31 |
| Mecanismo de activación de la proFO | 32 |
| Purificación de la proFO | 34 |
| Activación de la proFO | 35 |
| Determinación de la masa molecular relativa | 37 |
| Punto isoeiétrico | 39 |
| Efecto de la temperatura en la proFO y FO.. | 40 |
| Efecto del pH sobre la reacción de la FO..... | 43 |
| Prueba de inhibidores de la fenoloxidasa.. | 44 |

| | |
|---|-----|
| Especificidad de la FO.. | .45 |
| Discusión | .46 |
| Conclusiones | .59 |
| Perspectivas | .60 |
| Nombres científicos | .61 |
| Anexo | .62 |
| Referencias..... | .65 |
| Producción científica generada de este trabajo..... | .72 |

Lista de Tablas y Figuras

- Figura 1: Efecto de la **Melitina** en-la estabilidad de la **proFO obtenida** por centrifugación.
- Figura 2: Efecto de **la temperatura** de almacenamiento sobre la estabilidad de la **proFO**.
- Figura 3: Efecto del **STI** sobre la activación de la **proFO** por diferentes compuestos.
- Figura 4: Cromatografía de la **proFO** y FO en **Blue-Sepharose**.
- Figura 5: Electroforesis de la **proFO** y FO en gel de **acrilamida-SDS**.
- Figura 6: Electroforesis de la **proFO** y FO en gel de **acrilamida** nativo.
- Figura 7: Determinación del punto **isoelectrico** de la **proFO** y la **FO**.
- Figura 8: Efecto de la temperatura sobre la **proFO** y la FO.
- Figura 9: Efecto del tiempo de incubación a 58°C sobre la **proFO** y la FO.
- Figura 10: Efecto del pH sobre la reacción de FO.
- Figura II : Inhibición de la FO con diferentes compuestos.
- Figura 12: Determinación de la Km y la Vmáx. de la FO usando L-DOPA como sustrato.
-
- Tabla 1: Activación espontánea de la **proFO obtenida** por dos métodos.
- Tabla 2: Efecto de la **Melitina** en la estabilidad de la **proFO**.
- Tabla 3: Efecto del calcio en la activación de la **proFO** durante la obtención.
- Tabla 4: Activación de la **proFO** con diferentes compuestos.
- Tabla 5: Rendimiento en la purificación de **proFO**.
- Tabla 6: Activación de la **proFO** con compuestos biológicos.
- Tabla 7: Efecto de la temperatura como activador de la **proFO**.
- Tabla 8: Efecto de los inhibidores en la velocidad de reacción de la FO.
- Tabla 9: Tabla de máxima **absorción** con diferentes sustratos.
- Tabla 10: Km y Vmáx. de la FO con diferentes sustratos.

Abreviaturas

| | |
|------------------------|--|
| ADTC | Acido ditiocarbámico |
| BGBP | Proteína que une beta glucanos |
| Ca ⁺⁺ | Calcio |
| cm | Centímetro |
| Cu⁺⁺ | Cobre |
| EAprFO | Enzima activadora de la profenoloxidasa |
| EDTA | Acido etilen diamino tetracético |
| EGTA | Acido etilen glicol amino tetracético |
| FO: | Fenoloxidasa |

g

$$\text{Unidades de fuerza centrífuga: } g = 1.12r \left(\frac{RPM}{1000} \right)^2$$

Donde: r = Radio del rotor en mm.
RPM= Revoluciones por minuto.

| | |
|---------------|---|
| GRR | Glóbulos rojos de ratón |
| kDa | Kilodaltones |
| Km | Constante de Michaelis |
| L-DOPA | L-3,4 Dihidroxifenilalanina |
| LPS | Lipopolisacárido |
| µL | Microgramo |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| pg | Picogramo |
| PI | Punto isoeléctrico |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonil |
| proFO: | Profenoloxidasa |
| PTU | Feniltiourea |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| seg | Segundo |
| SIC | Solución isotónica para camarón |
| SLH | Sobrenadante de lisado de hemocitos |
| STI | Inhibidor de tripsina |
| TU | Tiourea |
| Vmáx | Velocidad máxima |

Glosario

| | |
|-----------------------|---|
| Aglutininas: | Molécula de origen protéico cuya fijación por el antígeno se manifiesta <i>in vitro</i> por una reacción de aglutinación. |
| Caotrópico: | Propiedad de una molécula para aumentar la entropía. |
| Citotoxicidad: | Propiedad que tienen ciertas moléculas para destruir células. |
| Encapsulación: | Aislamiento del parásito mediante la acumulación ordenada de células. |
| Exocitosis | Proceso de liberación del contenido granular, sin ruptura de las células. |
| Factores líticos: | Moléculas de origen protéico que destruyen la membrana celular. |
| Fagocitosis: | Ingestión de una partícula extraña por una célula. |
| Fenoles: | Compuestos aromáticos que tienen al menos un ión OH- en su molécula. |
| Formación de nódulos: | Acumulación celular alrededor de un parásito. |
| Hemocitos: | Células sanguíneas de invertebrados. |
| Inmunoglobulinas: | Término genérico que designa al conjunto de las globulinas séricas que componen los anticuerpos. |
| Lectinas | Molécula de origen protéico que tiene afinidad por azúcares. |
| Melanización: | Formación de melanina. |
| Melitina: | Polipéptido de 2,646 Daltons de masa molecular, compuesto por 40 ó 50% de veneno de abeja. |
| Respuesta celular | Reacción de defensa en la que participan directamente las células. |
| Respuesta humoral: | Reacción de defensa producida por moléculas extracelulares , por ejemplo anticuerpos. |
| Rf: | Movilidad relativa de una proteína, se calcula dividiendo la distancia de migración de la proteína entre la distancia de migración del colorante. |
| Zimógeno: | Forma inactiva de una enzima. |

Abstract

Prophenoloxidase (**ProPO**) is a zymogen found in the granules of granular haemocytes of crustaceans, this **proPO** is part of an enzymes cascade called **proPO** system which involves at least one serine protease. Activation of the **proPO** system produces phenoloxidase (PO), this enzyme oxidizes phenols to melanin. This system is considered a mechanism of non-self recognition because its activation products are bacteriostatic and fungicide compounds. It also promotes phagocytosis and encapsulation.

The **proPO** system can be activated by Gram negative bacteria¹ lipopolysaccharide, Gram positive bacteria¹ peptidoglycan and yeast **β -glucans**. This activation provokes liberation by controlled exocytosis of the **proPO** system contained in the cytoplasmic granules of the haemocytes.

Prophenoloxidase has been purified from haemocytes lysate supernatant of other arthropods, however in shrimp only its activation process and participation in phagocytosis have been demonstrated. Prophenoloxidase was obtained by osmotic shock to induce degranulation of the hemocytes. In this work the degranulation product was used as an initial sample to isolate **proPO** and to demonstrate participation of calcium on protease activation.

The prophenoloxidase was purified from blood cells of the brown shrimp *Penaeus californiensis*. The isolated **proPO** was analyzed on sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and a molecular mass of 113.9 kDa was observed. Its isoelectric point was 7.35. Both, profenoloxidase and phenoloxidase are liable to temperature higher than 40°C. The phenoloxidase reaction has an optimum pH of 8. Phenoloxidase was inhibited by DTCA and by copper. According to the substrate affinity and inhibition characteristics, the phenoloxidase of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*) is classified as a phenoloxidase tyrosinase-like enzyme.

Resumen

En los invertebrados las reacciones de defensa casi siempre están acompañadas de **melanización**. La fenoloxidasa es la enzima que **cataliza** la reacción de síntesis del pigmento melanina. Esta enzima se encuentra en forma inactiva dentro de los gránulos de las células sanguíneas de los artrópodos (hemocitos) y es el componente principal de un complejo sistema de reconocimiento y defensa llamado sistema profenoloxidasa. La activación de este sistema puede ser inducida por componentes de la pared celular de bacterias y levaduras y provoca la liberación del contenido granular. Durante el proceso de activación de la profenoloxidasa interviene una proteasa que convierte a la profenoloxidasa en una enzima activa (**fenoloxidasa**) por medio de una proteólisis controlada.

La profenoloxidasa ha sido aislada de crustáceos a partir de **lisado** de hemocitos, sin embargo en camarón solo se había demostrado su presencia y participación en la fagocitosis. En este trabajo se aisló la profenoloxidasa utilizando shock osmótico para inducir la degranulación de los hemocitos de camarón café (*Penaeus californiensis*) y se trabajó con el contenido granular.

Para la purificación de la profenoloxidasa se probaron diferentes tipos de cromatografía en columna, obteniéndose los mejores resultados con cromatografía de afinidad. Además se demostró la participación del calcio en la activación de la profenoloxidasa a través de su proteasa activadora.

La masa molecular **obtenida** por electroforesis en acrilamida en condiciones desnaturizantes fue de 113.9 **kDa** para la profenoloxidasa y de 106.6 **kDa** para la fenoloxidasa. El punto isoeléctrico para ambas formas de la enzima fue de 7.35. Las dos formas de la enzima son sensibles a la temperatura presentando una inactivación al ser incubadas a temperaturas mayores de 40°C. El pH óptimo en la reacción de la fenoloxidasa fue de 8. La mayor afinidad de la fenoloxidasa fue por el **sustrato** L-DOPA y el mayor porcentaje de inhibición fue ocasionado por el cobre y por el ácido ditiocarbámico.

Por las características cinéticas y de inhibición la forma activa de la enzima fue identificada como una tirosinasa (E.C. 1.14.18.1), parecida a la encontrada en langostino.

Introducción

Los mecanismos de defensa son generados como respuesta a **partículas** ajenas, mediante un sistema de reconocimiento de lo propio y lo extraño. En **los** vertebrados, el mecanismo de reconocimiento ha sido estudiado ampliamente y se ha demostrado que en la respuesta inmune participan inmunoglobulinas y linfocitos (Bach, 1984). Sin embargo, hasta la fecha, este tipo de componentes no ha sido detectado en invertebrados. Más aún, las bases moleculares que explicarían el mecanismo de reconocimiento y eliminación de patógenos no han sido dilucidadas (Leonard et al., 1985a; Ratcliffe, 1985; Ratcliffe et al., 1985; Söderhäll, 1992).

En los artrópodos, posiblemente el grupo de invertebrados más estudiado, se ha observado que en las reacciones de defensa contra microorganismos patógenos y oportunistas, existe una respuesta celular (Ratner y Vinson, 1983; Nappi et al., 1992; Ford et al., 1993; Johansson y Söderhäll, 1993) y una respuesta humoral (Lackie, 1980; Dunn, 1986; Brehélin et al., 1989; Ratcliffe y **Gotz**, 1990). Los mecanismos de defensa celular en artrópodos constan, principalmente de: fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos y citotoxicidad (Ratcliffe, 1985; Renwrantz, 1986; Lackie, 1988; Johansson y Söderhäll, 1989a; Ratcliffe et al., 1991; Johansson y Söderhäll, 1992). La inmunidad humoral, por su parte, incluye factores moleculares como: **lectinas**, aglutininas, enzimas, citoquininas y factores líticos (Vasta y Marchalonis, 1983; Vasta y Cohen, 1984; Söderhäll et al., 1986; Ratanapo y Chulavatnatol, 1990; Vargas-Albores, 1992; Vargas-Albores et al., 1992; Guzmán-Murillo et al., 1993; Vargas-Albores et al., 1993a; Vargas-Albores, 1995).

El sistema profenoloxidasa (**proFO**) ha sido considerado como un componente integral del sistema inmune de artrópodos y responsable de las funciones de reconocimiento y defensa (Söderhäll, 1982; Ashida y Söderhäll, 1984; Söderhäll y Hall, 1984; Renwrantz, 1986; Söderhäll et al., 1986; Ashida, 1990; Ashida y Yamazaki, 1990; Söderhäll, 1992). Esto se debe básicamente a dos

propiedades del sistema **proFO**: 1) puede ser estimulado por pequeñas cantidades de polisacáridos microbianos (Söderhäll, 1982; Ashida *et al.*, 1983; Söderhäll *et al.*, 1994; Vargas-Albores, 1995); 2) tiene la habilidad para estimular actividades celulares de defensa (Söderhäll, 1982; Ashida y Söderhäll, 1984; Ratcliffe *et al.*, 1984; Johansson y Söderhäll, 1989b; Rizki y Rizki, 1990; Nappi *et al.*, 1991; Söderhäll, 1992).

El componente final de la activación del sistema **proFO** es la fenoloxidasa (FO) (EC:1.10.3.1:odifenoil:oxígeno reductasa), la cual oxida difenoles produciendo quinonas. Estos compuestos, continúan su transformación por vía no enzimática hasta llegar a melanina (Söderhäll, 1982; Söderhäll y Ajaxon, 1982; Johansson y Söderhäll, 1989b; Ashida y Yamazaki, 1990; Ratcliffe *et al.*, 1991; Andersen *et al.*, 1992). La melanina es importante en los mecanismos de defensa, ya que es capaz de promover la encapsulación física de hifas de hongos, tejidos aberrantes, bacterias y parásitos (Ratcliffe y Rowley, 1979; Lackie, 1980; Söderhäll *et al.*, 1984; Collins *et al.*, 1986; Rizki y Rizki, 1990). Además la melanina y sus precursores pueden inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Söderhäll y Ajaxon, 1982).

El sistema **proFO** consiste en una cascada de reacciones que involucra proteasas y otros factores que son activados secuencialmente (Leonard *et al.*, 1985a; Ratcliffe, 1985; Ratcliffe *et al.*, 1984; Aspán *et al.*, 1990; Söderhäll, 1992). En insectos, este sistema está presente tanto en plasma (Ashida, 1981; Sauti y Sugumaran, 1987; Saul y Sugumaran, 1988; Brehélin *et al.*, 1989; Ashida y Yamazaki, 1990) como en el interior de los hemocitos (Leonard *et al.*, 1985a; Ashida *et al.*, 1988; Ashida, 1990). El sistema **proFO** de los crustáceos, aparentemente se encuentra confinado al interior de los hemocitos (Söderhäll y Smith, 1983; Johansson y Söderhäll, 1989b; Vargas-Albores *et al.*, 1993a) y bajo condiciones experimentales no ha podido ser detectado en plasma.

En el sistema **proFO** de los artrópodos existen dos componentes importantes: la profenoloxidasa, que da origen a la FO (Söderhäll, 1982; Johansson y Söderhäll, 1989b; Ashida, 1990) y la enzima encargada de activarla, la cual ha

sido denominada como enzima activadora de la profenoloxidasa (**E_AproFO**) (Leonard et al., **1985b**; Aspán et al., 1990; Aspán y Söderhäll, 1991;). Ambas se encuentran en forma inactiva en los gránulos de los hemocitos (Johansson y Söderhäll, 1985) y son transformadas a su forma activa durante la estimulación de los hemocitos. Esta compartimentalización del sistema **proFO** puede ser una importante medida de control y regulación de la liberación del sistema (Söderhäll et al., 1990; Söderhäll et al., 1994)

La liberación del sistema **proFO** es producto de la estimulación de los hemocitos, provocada por lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas (Rowley y **Rahmet-Alla**, 1990; Ratcliffe et al., 1991; Johansson y Söderhäll, 1992; Lanz et al., **1993**), glicoproteínas de bacterias Gram positivas (Söderhäll y Unestam, 1979; Ashida et al., 1983; Brookman et al., **1989**), y β -1,3 glucanos de pared celular de hongos o microalgas (Söderhäll et al., 1988; Ashida y Yamazaki, 1990; Vargas-Albores et al., 1996). La liberación de gránulos es llevada a cabo por una exocitosis perfectamente controlada (Unestam y Söderhäll, 1977; Smith y Söderhäll, 1986; Söderhäll et al., 1986; Ashida, 1990).

Se ha encontrado que el tamaño mínimo de la cadena de β -1,3-glucano para disparar la activación del sistema **proFO**, tanto en insectos (Ashida et al., 1983; Brookman et al., 1989) como en crustáceos (Söderhäll, 1982; Barracco et al., 1991), es un oligosacárido de 5 unidades de glucosa, .

Los activadores biológicos del sistema **proFO** son reconocidos por algún componente sérico antes de estimular las células. Este es el caso de la proteína sérica llamada BGBP (del inglés: Beta Glucan Binding Protein), la cual, como su nombre lo indica, tiene la capacidad de unirse a β -1,3-glucanos. Esta proteína ha sido purificada, tanto de insectos (Söderhäll et al., 1988; Ochiai et al., 1992), como de crustáceos (Duvic y Söderhäll, 1990; Duvic y Söderhäll, 1993; Thörnqvist et al., 1994; Vargas-Albores et al., 1996). Una vez que reacciona con laminarina (beta glucanos), el complejo BGBP-laminarina (BGBP-L) tiene la capacidad de inducir la activación del sistema **proFO**, la cual es mayor que cuando se utiliza solamente el beta **glucano** (Söderhäll et al., 1990; Söderhäll,

1992; Duvic y **Söderhäll**, 1993; **Söderhäll et al.**, 1994; Vargas-Albores, 1995; Vargas-Albores **et al.**, 1996). Además, otras funciones celulares también pueden ser estimuladas por el complejo **BGBP-L**, posiblemente como consecuencia de la activación del sistema **proFO** (**Barracco et al.**, 1991).

La presencia de los sitios de unión para el complejo **BGBP-L** en la superficie de los hemocitos fue demostrada con inmunofluorescencia usando antisuero contra esta proteína. Con la purificación de los receptores de membrana de hemocitos de la langosta, se demostró que la **BGBP** solamente puede unirse a ellos, después de la reacción con laminarina (Duvic y **Söderhäll**, 1992).

En forma *in vivo*, la **proFO** es hidrolizada y transformada en **FO** por una serin-proteinasa (**EAprFO**), sin embargo *in vitro*, otras enzimas proteolíticas, como tripsina y **quimotripsina** también pueden activar a la **proFO** (**Söderhäll y Hall**, 1984; Yoshida y Ashida, 1986). Aparentemente, la activación por tripsina o quimotripsina se lleva a cabo por el mismo mecanismo que la **EAprFO** (**Aspán et al.**, 1990; **Söderhäll**, 1992). Por otra parte, algunas sustancias orgánicas también son capaces de activar a la **proFO**, sin embargo este proceso parece ser por una vía no proteolítica. Entre los activadores químicos están los detergentes (SDS), ácidos grasos (Sugumaran y Nellaiappan, 1991) y solventes orgánicos como etanol y acetona (**Brehélin et al.**, 1989; **Lockey y Ourth**, 1992; **Hernández-López**, 1996).

Un sistema con alta actividad enzimática debe de contar con reguladores que permitan mantener su actividad dentro de parámetros fisiológicos adecuados. Para la regulación del sistema **proFO** se han descrito inhibidores plasmáticos tales como inhibidores de tripsina y α_2 macroglobulina (**Saul y Sugumaran**, 1986; **Hergenbahn et al.**, 1988; **Armstrong et al.**, 1991; **Brehélin et al.**, 1991). Estos reguladores tienen como función principal reducir la actividad proteolítica generada durante la liberación del contenido **granular** de los hemocitos, evitando la acción de la proteasa en lugares no deseados (**Hergenbahn et al.**, 1988; **Armstrong et al.**, 1991; **Brehélin et al.**, 1991; **Stöcker et al.**, 1991; **Liang et al.**, 1992).

Antecedentes

El sistema **proFO** ha sido propuesto como un mecanismo de reconocimiento y defensa en crustáceos e insectos (**Söderhäll**, 1982, Ashida y Söderhäll, 1984; Ratcliffe *et al.*, 1984; Leonard *et al.*, 1985a; Ratcliffe, 1985; Johansson y Söderhäll, 1989b; Ashida, 1990; Stöcker *et al.*, 1991; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994), y hasta la fecha se han aislado y caracterizado algunos de sus componentes. Dentro de los más importantes se encuentran: la profenoloxidasa, la enzima activadora de la **proFO**, y proteínas que se une a sacáridos microbianos (**β -glucanos** y **LPSs**).

El reconocimiento está a cargo de proteínas plasmáticas que se unen específicamente al agente extraño y, en algunos casos, tienen la capacidad de activar sistemas de defensa más complejos. Algunas de estas proteínas con capacidad de reconocer y unirse a LPS y a **β -glucanos** han sido detectadas en el plasma de crustáceos. Una proteína que se une a LPS, ha sido aislada de hemolinfa de camarón café (Vargas-Albores *et al.*, 1993a) la cual es capaz de aglutinar bacterias Gram negativas. Esta proteína tiene una masa molecular de 170-180 **kDa** y está formada por 4 subunidades de 41 **kDa**. De la misma manera, Kopáček, *et al.*, (1993), aislaron del plasma de la langosta *Pacifastacus leniusculus*, una proteína de 420 **kDa** que presenta afinidad por LPS. De *Penaeus monodon* también se aisló una **lectina** que induce la aglutinación de *Vibrio vulnificus* (Ratanapo y Chulavatnatol, 1992).

Por otra parte, la proteína que se une a **β -glucanos** (Beta glucan binding protein: BGBP) se ha logrado purificar a partir del plasma de *Pacifastacus leniusculus* (Duvic y Söderhäll, 1990), *Asfacus asfacus* y *Procambarus clarkii* (Duvic y Söderhäll, 1993) y *Carcinus maenas* (Thömqvist *et al.*, 1994). Esta proteína es un monómero con masa molecular de 95-100 **kDa** (Söderhäll *et al.*, 1994) y, además, tiene la capacidad de estimular la activación del sistema **proFO**, cuando está unida a un **β -glucano** además de otros fenómenos celulares, como la degranulación (Barracco *et al.*, 1991). Una proteína similar

también ha sido detectada en el camarón café (*P. californiensis*) y tiene propiedades químicas y biológicas similares a la reportada para otros crustáceos (Vargas-Albores et al., 1996).

La BGBP tiene aparentemente la capacidad de tener dos sitios funcionales biológicamente activos: uno que se une al **glucano** y otro **que reconoce un receptor** en la membrana del **hemocito** (Duvic y Söderhäll, 1992; Vargas-Albores, 1995). La reacción con **glucanos** y consecuentemente la formación del complejo BGBP-glucano, es un requisito para que se lleve a cabo la interacción con el **hemocito** (Duvic y Söderhäll, 1992). La unión del complejo a los receptores de membrana provoca la exocitosis y con **esto** la liberación del contenido granular (Söderhäll et al., 1986; Duvic y Söderhäll, 1992).

Una vez liberado el contenido granular de los hemocitos al plasma, la enzima activadora de la **proFO** puede activarse. Esta proteína ha sido purificada de los hemocitos de la langosta, *Pacifastacus leniusculus* (Aspán et al., 1990) e identificada como una proteinasa tipo **serina**, con una masa molecular de aproximadamente 35 kDa. Esta enzima convierte proteolíticamente la **proFO** de 76 kDa, en péptidos de 60 y 62 kDa, ambos con actividad fenoloxidasas. Sin embargo, cuando la **proFO** es hidrolizada por **tripsina**, solamente se liberan péptidos de 60 kDa (Aspán et al., 1990). La **proFO** se ha purificado de los hemocitos de algunos artrópodos (Andersson et al., 1989; Aspán y Söderhäll, 1991; Durrant et al., 1993) y recientemente se determinó la secuencia de aminoácidos de la **proFO** de la langosta (*Pacifastacus leniusculus*) (Aspán et al., 1995). La **proFO** de la langosta tiene una masa molecular de 80.732 kDa, dos moléculas de cobre y dos sitios de unión a este metal, los cuales son parecidos a aquellos presentes en la hemocianina de artrópodos (Aspán et al., 1995).

La **proFO** también ha sido aislada y purificada de varios insectos, tanto del plasma como del interior de los hemocitos. En *Hyalóphora cecropia*, la **proFO** detectada en plasma se presenta en dos formas, ambas con masa molecular de 76 kDa, que pueden ser activadas por **serin-proteinasa**s obtenidas de la misma fuente y en presencia de calcio (Andersson et al., 1989).

En los insectos, la **proFO** también se ha purificado a partir de hemocitos de larvas de *Oryctes rhinoceros*, pero su caracterización solamente se realizó en la enzima activa (Thangaraj et al., 1990). También se ha aislado la **proFO** intracelular de la cucaracha (*Blaberus discoidalis*), donde se reporta como una glicoproteína polimérica constituida de unidades monoméricas de 76 kDa, con un pI de 5.2. Esta proteína puede ser convertida a FO por tratamiento con tripsina (Durrant et al., 1993). Debe recordarse que en general, el tratamiento proteolítico, incluyendo tripsina, activa la **proFO** (Unestam y Söderhäll, 1977; Aspán et al., 1990).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado que la **proFO** también puede ser activada por agentes químicos como son los detergentes y los solventes, dentro de los que se encuentran: dodecil sulfato de sodio (SDS) y cloruro de cetilpirimidinio (Sugunmaran y Nellaippan, 1991) o metanol y acetona (Lockey y Ourth, 1992; Brehélin et al., 1989). El sistema **proFO** también puede ser activado por calor y por ausencia de calcio (Ashida y Söderhäll, 1984; Dularay y Lackie, 1985). Sin embargo este mecanismo de activación no involucra un proceso proteolítico y parece estar asociado a cambios estructurales en la molécula, más que a una modificación en su secuencia.

El componente final del sistema **proFO** es la fenoloxidasasa (Ratcliffe et al., 1985; Söderhäll, 1982; Ashida y Yamazaki, 1990), enzima que presenta dos especificidades ya que cataliza tanto la o-hidroxilación de monofenoles, como la oxidación de difenoles (Dixon et al., 1979). De esta manera la enzima es capaz de convertir la tirosina a DOPA, así como la DOPA a dopaquinona (Lerch, 1988; Aspán et al., 1995). Esta dopaquinona se transforma en melanina mediante una reacción no enzimática (Pawelek, 1991). Tanto la melanina como las quinonas producidas en esta reacción poseen actividad fungistática y bactericida (Söderhäll y Ajaxon, 1982; Rowley y Rahmet-Alla, 1990). En artrópodos este pigmento es también producido en la cutícula después de una herida o como resultado de un ataque por parásitos (Ratcliffe et al., 1985; Saul y Sugumaran, 1988; Ashida y Yamazaki, 1990; Nappi et al., 1991).

La fenoloxidasa, por su parte, se ha caracterizado por ser una proteína que tiene capacidad de unirse inespecíficamente a superficies como el vidrio y polímeros de azúcares. Aunque esto puede tener importancia biológica para el organismo vivo (Johansson y Söderhäll, 1989b), *in vitro* estas uniones inespecíficas han dificultado su purificación. Esta enzima ha sido aislada y caracterizada de hemocitos y de la hemolinfa de insectos (Ashida y Yamazaki, 1990; Thangaraj et al., 1990; Lockey y Ourth, 1992) y de los hemocitos de crustáceos como el langostino (Aspán y Söderhäll, 1991; Aspán et al., 1995), sin embargo en crustáceos peneidos la mayoría de los estudios han sido de FO de la cutícula (Simpson et al., 1987; 1988; Chen et al., 1992).

En camarón, el conocimiento de los mecanismos de defensa y más aún, del sistema profenoloxidasa, es escaso. Dentro de los estudios sobre camarón café se encuentran los estudios de Guzmán-Murillo, et al., (1993), donde describen la presencia de actividad hemolítica en el plasma de este crustáceo. Aunque no encuentran relación entre el factor hemolítico y el sistema profenoloxidasa, mencionan que es un componente del sistema de defensa. Otros posibles factores de defensa son las aglutininas las cuales han sido identificadas en *Penaeus stylirostris* (Vargas-Albores et al., 1992), *P. monodon* (Ratanapo y Chulavatnatol, 1990) y *P. californiensis* (Vargas-Albores et al., 1993a) y tienen la capacidad de reaccionar con Vibrios.

De los estudios sobre el sistema proFO del camarón se encuentran los realizados por Simpson et al., (1987; 1988) donde purifican y obtienen algunas propiedades cinéticas de la FO de cabezas de camarón rosa (*P. duorarum*) y blanco (*P. setiferus*). Sin embargo estos trabajos están encaminados a la industria de alimentos, con la finalidad de encontrar un mejoramiento de la presentación del producto y no para estudiar los mecanismos de defensa.

En el camarón café se ha detectado la actividad fenoloxidasa en los hemocitos (Vargas-Albores, 1992) y se ha estudiado su mecanismo de activación (Hernández-López, 1996; Hernández-López et al., 1996). Sin embargo no se tiene información sobre las características moleculares de la enzima, por lo que

este trabajo pretende determinar las principales propiedades de la enzima fenoloxidasa **y profenoloxidasa**, así como los factores que influyen sobre las reacciones que catalizan, como una contribución al conocimiento de los sistemas de defensa del camarón.

Justificación

La alta mortalidad que se presenta durante los primeros estadios **larvarios** del camarón es uno de los principales problemas que deberán ser resueltos por la camaronicultura. Factores como pobre calidad del agua y nutrición inadecuada son frecuentemente determinantes básicos para que aparezcan enfermedades en los sistemas acuaculturales. Estas se incrementan debido a que en los cultivos se tiende a mantener altas densidades de organismos, lo que favorece el desarrollo de enfermedades infecciosas (Lightner, 1983).

En crustáceos, sobre todo en los de importancia comercial, el sistema **proFO** deberá ser estudiado desde el punto de vista inmunológico con el fin de crear técnicas de diagnóstico y manipulación del sistema de defensa de los organismos en cultivo (Vargas-Albores et al., 1991; Vargas-Albores, 1992; Vargas-Albores, 1995). Esto permitiría ofertar una alternativa para la prevención de enfermedades infecciosas, a través de técnicas o procedimientos inmunoestimuladores.

Los estudios del sistema **proFO** se iniciaron en insectos, obteniéndose aportaciones importantes que pueden llegar a ser aplicadas. Entre ellas están las observaciones de que en *Anopheles gambiae*, un vector para la malaria, existen cepas resistentes que pueden encapsular los ookinetos del parásito de la malaria **con melanina**. Esta **melanización** puede detener la infección en larvas de mosquito y la posterior transmisión de **la enfermedad** a animales superiores, incluyendo el hombre (Collins y Besansky, 1994).

El sistema **proFO** es responsable, además de la **melanización**, de activar otras respuestas celulares que permiten la eliminación de los patógenos (Söderhäll y Ajaxon, 1982; Johansson y Söderhäll, 1989b; Ashida y Yamazaki, 1990; Rizki y Rizki, 1990; Ratcliffe et al., 1991; Söderhäll, 1992). Así, el aislamiento de la **proFO** y la descripción de sus características ayudará a conocer el funcionamiento del sistema **proFO** y a determinar el papel biológico en el sistema de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*). Este conocimiento es básico para poder desarrollar técnicas de diagnóstico temprano y herramientas profilácticas.

Objetivos

1. Aislar la profenoloxidasa de los hemocitos del camarón **café** (*Penaeus californiensis*).
2. Determinar las **características** moleculares de la **profenoloxidasa** y de la fenoloxidasa: masa molecular, punto isoelectrico y masa molecular.
3. Determinar las características enzimáticas de la fenoloxidasa: cinética, sustratos, Km. Así como el pH óptimo de la reacción *in vitro*.
4. Determinar activación por: calor, congelación, compuestos biológicos (lipopolisacáridos, laminarina), enzimas proteolíticas (tripsina, quimiotripsina), detergentes (SDS) y solventes orgánicos (metanol, acetona).

Materiales y Métodos

Organismos

Se utilizó camarón café (*Penaeus californiensis*), de ambos sexos, aparentemente sanos, con tallas que fluctuaron entre 10 y 12 cm. Los animales fueron obtenidos de los estanques de mareas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste y se mantuvieron en acuarios de 200 L con aeración constante y una salinidad de 36 ppm. Durante el tiempo que permanecieron en los acuarios se alimentaron con peletizado comercial "Camaronina".

Reactivos

L-DOPA, tripsina de páncreas de bovino, reactivos de tinción de plata, cacodilato de sodio, **Sephacryl™**, Sepharose **6B™**, marcadores de masa molecular, fenol, **catecol**, tirosina, melitina, acrilamida, bis acrilamida y azul de Coomassie fueron adquiridos de Sigma Chem Co (San Louis, Missouri U.S.A.) **Heparin-Sepharose™** y **Blue-Sepharose™** se obtuvieron de Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Obtención de la hemolinfa

La hemolinfa se obtuvo por punción en la región ventral en la base de los pleópodos, entre los límites de la región formada por el perión y el pleón. Durante la extracción, por cada volumen de hemolinfa se utilizaron dos volúmenes de solución anticoagulante (anexo), de acuerdo a la técnica descrita por Vargas-Albores et al., (1993b).

Obtención de hemocitos

La hemolinfa **òbtenida** se centrifugó a 600 g durante 3 **min** a temperatura ambiente. Se retiró el plasma y las células se resuspendieron en solución anticoagulante para lavarse dos veces, centrifugando a 600 g durante 3 **min**.

Obtención de **proFO** a partir de **lisado** de hemocitos

Los hemocitos, previamente lavados, se resuspendieron en una solución amortiguadora de cacodilatos (anexo) y se **lisaron** por **ultrasonido**, utilizando un sonicador Cole Palmer modelo CP 250B, a 20 **volts** por 2 **min**. El **lisado** de hemocitos se centrifugó a 70,000 **g**, 4°C, durante 30 **min** en una ultracentrífuga Beckman modelo L77 y el sedimento fue desechado. El sobrenadante del **lisado** de hemocitos (SLH) fue utilizado como fuente de **proFO** de hemocitos, de acuerdo a **Söderhäll** (1981).

Obtención de **proFO** por centrifugación

Las células lavadas se resuspendieron suavemente en amortiguador de cacodilatos y se centrifugaron a 15,900 g por 1 **min**. Las células se desecharon y el sobrenadante se utilizó como fuente de profenoloxidasas.

Determinación de actividad FO

Método en tubo: Siguiendo el método descrito por Leonard et al., (1985a). Se incubaron 50· μ L de muestra con 50 μ L del **sustrato** (L-DOPA, 3 mg/mL), durante 10 **min**. Se ajustó el volumen a 1 mL con amortiguador de cacodilatos y se determinó la densidad óptica a 490 nm en un espectrofotómetro Beckman Modelo DU-600.

Método en microplaca: Se utilizó el método descrito por Hernández-López (1996), que permite trabajar con volúmenes pequeños. Se incubaron 50 μL de muestra con 50 μL de amortiguador de cacodilatos durante 10 min, posteriormente se agregaron 50 μL de L-DOPA y se incubó a 25°C por 10 min. Finalmente se determinó la absorbancia de las muestras a 492 nm en un lector de placas Labsystem Uniscan. La actividad específica es expresada como el cambio de absorbancia por minuto por miligramo de proteína.

Detección de profenoloxidasas

La **proFO** no tiene actividad enzimática, por lo que es necesario convertirla en la enzima activa (FO). Para ello, se incubaron 50 μL de muestra con 50 μL de tripsina 0.1 mg/ml durante 10 min, posteriormente se siguió la metodología establecida para determinación de la actividad de fenoloxidasas.

La cantidad de **proFO** es expresada como la actividad específica de FO y generalmente reportada como el porcentaje de **proFO** residual o disponible, la cual fue el resultado de la diferencia de la **proFO** menos la fenoloxidasas.

Purificación de la **proFO**

La purificación se inició a partir de 10 mL de plasma, obtenida de 20 animales juveniles aparentemente sanos, ambos sexos. Las células fueron separadas del plasma por centrifugación a 800 g a 4°C durante 5 min y se lavaron tres veces con anticoagulante. El paquete celular se resuspendió en amortiguador de cacodilatos sin calcio y se centrifugó a 15,900 g. Posteriormente, 3.6 mL de **proFO** obtenida por centrifugación, con una concentración de proteínas de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se centrifugaron a 70,000 g durante 16 horas a 4°C. La **proFO** se recuperó en 1 mL del fondo del tubo y se aplicó a una columna de Blue-Sepharose de 11 x 1 cm previamente equilibrada con cacodilatos 10 mM pH 7.4. La columna se lavó con 30 mL de la misma solución a un flujo de 1 mL/min. Después se aplicó una solución de cloruro de sodio 1.5 M para remover las

tuvieron afinidad por el soporte. A todas las fracciones colectadas (1mL cada una) se les determinó la actividad de fenoloxidasa, la presencia de proFO y la concentración de proteínas

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al., (1951), utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como referencia.

Para detectar proteínas en las fracciones de la cromatografía se utilizó una modificación del método de Bradford (1976), el cual consiste en incubar, en microplacas de 96 pozos, 25 μL de muestra con 200 μL de reactivo de Bradford, durante 15 min. Posteriormente se determina la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas Labsystem Uniscan.

Electroforesis

Todas las electroforesis se hicieron en el sistema vertical de mini Protean II (Bio-Rad), utilizando geles de poliacrilamida de 8 x 10 cm, con una concentración de acrilamida de 7.5%.

Condiciones desnaturalizantes: La muestra se diluyó 1:2 con el amortiguador TRIS-glicina-SDS, pH 6.8 y se aplicaron 25 μL de muestra. La electroforesis se corrió a 25 mA (75 volts) durante 2 horas, utilizando TRIS-glicina-SDS pH 8.3, como amortiguador de corrimiento.

Condiciones nativas: La muestra se diluyó 1:2 con TRIS-Glicina, pH 6.8 y se aplicaron 25 μL de muestra en la parte superior del gel. La electroforesis se corrió a 35 mA (100 volts) durante 2.5 horas, utilizando TRIS-glicina como amortiguador de corrimiento.

Revelado de los geles de electroforesis

Para revelar los geles de electroforesis se utilizaron tres métodos diferentes: dos para tinción de proteínas (Coomasie y plata) y uno para la detección de la actividad enzimática.

Para la tinción de proteínas por azul de Coomassie, los geles se incubaron con este colorante, durante 30 min en agitación a temperatura ambiente y después se colocaron en una solución de desteñido hasta que las bandas fueron visibles.

La tinción de plata para proteínas se realizó siguiendo las instrucciones del kit (Sigma Chem. Co.), el cual está basado en el método descrito por Marshall (1984).

Para revelar la actividad de la fenoloxidasa los geles se sumergieron en una solución del sustrato L-DOPA a una concentración de 3 mg/mL, incubándose a temperatura ambiente de 30 a 60 min, después el gel se lavó varias veces con agua destilada.

Para revelar las bandas de proFO, los geles se incubaron previamente con tripsina (1 mg/mL) por 30 min. Se retiró la solución de tripsina y el gel se incubó con el sustrato para detectar actividad de fenoloxidasa.

Determinación de la masa molecular.

La masa molecular relativa de la fenoloxidasa y de la profenoloxidasa se determinó por electroforesis utilizando marcadores de masa molecular conocida y haciendo una regresión lineal de los Rf. Las proteínas marcadoras utilizadas y sus respectivas masas moleculares (kDa) fueron: β -galactosidasa (116), fosforilasa (97.4), albúmina sérica bovina (66) y ovoalbúmina (45).

Punto isoelectrico (pI)

El punto **isoelectrico** fue determinado por enfoque isoelectrico en geles **de** poliacrilamida utilizando el sistema Phast **System®** (Pharmacia). Se **utilizaron** geles con un rango de pH de 3-9 y se aplicaron 2 **µL** de muestra. Los estándares utilizados fueron: **Lectinas** de lenteja básica media y ácida, mioglobina de caballo ácida y básica, anhidrasa carbónica de humano, anhidrasa carbónica de bovino, lacto albúmina, inhibidor de tripsina de **soya** y amiloglucosidasa. La presencia de proteína se determinó tiñendo con nitrato de plata y por actividad enzimática.

Efecto de la temperatura sobre la **proFO** y FO

Se determinó el efecto directo de la temperatura sobre la **proFO** y de la FO, incubando a temperaturas de 25, 35, 40, 45, 50, 60 y 70°C durante 30 min. La **proFO** disponible se determinó incubando posteriormente las muestras con tripsina y detectando la actividad con L-DOPA. El efecto sobre la FO se determinó incubando la **proFO** con tripsina 0.1 **mg/ml** para convertirla a FO, se incubó a las temperaturas antes mencionadas durante 30 min y posteriormente se determinó la actividad FO.

Inhibidores

Los inhibidores se prepararon a una concentración de 10 mM. El zimógeno **proFO** se incubó previamente con tripsina (0.1 **mg/mL**), para asegurar su conversión a FO. Posteriormente se agregaron 50 **µl** de los inhibidores incubándose durante 30 min. La actividad FO se midió utilizando L-DOPA como sustrato, siguiendo la metodología descrita con anterioridad. Los inhibidores fueron: tiourea (TU), azida de sodio, feniltiourea (FTU), ácido dietilditio-carbámico (ADTC), Cobre, EGTA y EDTA. Para el efecto del cobre como inhibidor, se utilizaron diferentes concentraciones (5, 10, 100 mM) determinando la actividad residual por el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Determinación de la Km y la velocidad máxima

La especificidad de la FO de camarón café se realizó utilizando una solución 10 mM de los siguientes sustratos: L-DOPA, **catecol**, metilcatecol, fenol, tirosina, tiramina, hidroquinona y resorcinol. La velocidad de la reacción se calculó a través de un método cinético a longitud de onda de máxima absorción (λ máx) de cada uno de las reacciones, utilizando un espectrofotómetro Beckman DU-600. Con estos resultados se calculó la Km para cada sustrato.

Para determinar la Km y la velocidad máxima de la FO, se incubaron 50 μ L de proFO con 50 μ L de tripsina (0.1 mg/mL) durante 10 minutos a 25°C, con lo que se aseguró la formación de FO. Posteriormente se adicionaron 50 μ L de concentraciones crecientes del sustrato, ajustándose el volumen a 700 μ L. La actividad enzimática se cuantificó por aumento de la absorbancia a la longitud de máxima absorción durante 15 min. Con los valores de absorbancia obtenidos se calculó la velocidad de reacción a través de una **regresión** lineal de los valores de absorbancia para cada concentración de **sustrato** y posteriormente se **graficaron** los inversos de las concentraciones de **sustrato** contra los inversos de las velocidades de reacción observándose un comportamiento lineal. De acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten y ajustando al modelo gráfico de Lineweaver-Burk, la Km puede calcularse usando la intersección negativa en el eje x, mientras que la velocidad máxima se calculó usando la pendiente o la intersección en el eje y, utilizando el procesador de gráficos **Jandel Scientific SigmaPlot**.

Ecuación de Michaelis-Menten:

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

La λ máx se determinó incubando 50 μ L de proFO con 50 μ L de tripsina (0.1 mg/mL) y posteriormente se agregaron 50 μ L del sustrato a probar. Desarrollado el color se agregaron 550 μ L de amortiguador de fosfatos pH 7.5 y

se realizó un barrido espectrofotométrico entre 380 y 600 nm. El blanco fue la misma mezcla excepto la FO.

Resultados

El aislamiento de la **proFO** del camarón café se **planteó** como el primer paso para realizar los estudios de su caracterización bioquímica. Por ello, y siguiendo la técnica descrita para la **purificación** de la **proFO** de otros invertebrados incluyendo crustáceos (Andersson et al., 1989; Aspán y **Söderhäll**, 1991; Durrant et al., **1993**), se intentó el aislamiento a partir del **lisado** de hemocitos de camarón café. Sin embargo, en las muestras obtenidas de esta forma, la proenzima presentó problemas de estabilidad manifestándose por una activación espontánea. Al utilizar el sobrenadante del **lisado** de células (SLH) del camarón, se pudo observar que cerca del 50% de la **proFO** era transformada en FO (activación espontánea), como se puede apreciar en la tabla 1.

La **proFO** es liberada de los hemocitos cuando son centrifugados a 15,900 g (Hernández-López et al., 1996). Este procedimiento permitió la obtención de la **proFO** por degranulación de las células y se pudo recuperar una muestra con menor porcentaje de activación espontánea. En la tabla 1 se comparan los resultados obtenidos en la recuperación de la **proFO** por centrifugación y por lisis de los hemocitos del camarón café. En ambos casos el amortiguador usado fue cacodilatos con 10 mM de calcio. De acuerdo a estos resultados, para posteriores experimentos la muestra fue extraída por centrifugación.

Tabla 1: Comparación de la activación espontánea de la **proFO** obtenida por dos métodos. Los valores representan el porcentaje relativo \pm la desviación patrón de 3 réplicas.

| | FO | proFO |
|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Lisado | 57.7 \pm 5.2 | 42.3 \pm 9.59 |
| Centrifugado | 22.7 \pm 0.48 | 77.3 \pm 1.13 |

Efecto de la **melitina**

A pesar de **que** el método por centrifugación permitía recuperar un buen porcentaje de la proteína en forma inactiva, con el tiempo, la proenzima continuaba activándose espontáneamente. Por **ello**, se buscó una alternativa para mantener estable la muestra de **proFO** durante más tiempo. La **melitina** ha sido reportada como un inhibidor de la activación del sistema **proFO** de la langosta (**Söderhäll**, 1985; Aspán y Söderhäll, 1991), por lo que se intentó su utilización con muestras de camarón café. La extracción del sistema **proFO** del camarón se realizó resuspendiendo los hemocitos en una solución de cacodilatos que contenía 10 **mM** de calcio y 50 $\mu\text{g/mL}$ de-melitina. Las células se centrifugaron a 15 900 g durante 1 **min**, a **25°C** y el paquete celular se desechó. La cantidad de **proFO** fue determinada en el sobrenadante utilizando tripsina para activarla, ya que la **melitina** no interfiere en la activación de la **proFO** por tripsina (Aspán y Söderhäll, 1991). El tratamiento con **melitina** logró una disminución significativa en la activación espontánea, como puede apreciarse en la tabla 2. La actividad espontánea de la FO presente en la muestra disminuyó hasta un 11% cuando las muestras se analizaron inmediatamente después de la obtención.

Tabla 2: Efecto de la **melitina** (Mel) en la estabilidad de la **proFO**. Los valores de porcentaje relativo representan la media de 3 determinaciones \pm la desviación patrón.

| | FO | proFO |
|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Cacodilatos-Ca | 22.69 \pm 0.18 | 77.30 \pm 0.26 |
| Caodilatos-Ca+Mel | 11.34 \pm 0.49 | 88.59 \pm 0.52 |

El uso de **melitina** también incrementó la estabilidad de la **proFO** durante el almacenamiento de las muestras a **5°C**, recuperándose un 95% de **proFO**

original 48 horas después de su obtención (Figura 1). Para este experimento, las muestra-s se obtuvieron por centrifugación, manteniendo

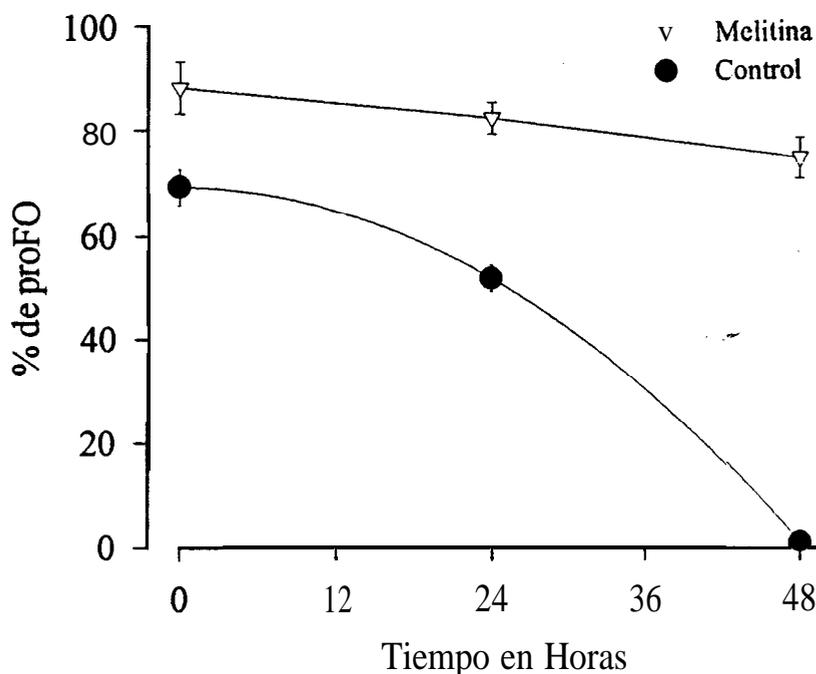


Fig. 1 Efecto de la **melitina** en la estabilidad de la **proFO** en muestras obtenidas por centrifugación. Los resultados expresados son la media de tres determinaciones. Las barras representan la desviación patrón.

melitina en todos los pasos del proceso. Las muestras se almacenaron en **alícuotas** a 0 y 5 °C, analizándose cada 24 h y determinando la cantidad de FO y **proFO**. De este modo, se pudo observar que a 5°C la **melitina** reduce la activación espontánea de la muestra hasta por 7 días, sin que se observen variaciones importantes en la cantidad de **proFO**. Sin embargo, cuando las muestras fueron almacenadas a 0°C, se observó una activación espontánea a partir de las primeras 24 horas y aumentó hasta llegar al 50% de actividad residual a los 7 días, como se aprecia en la figura 2.

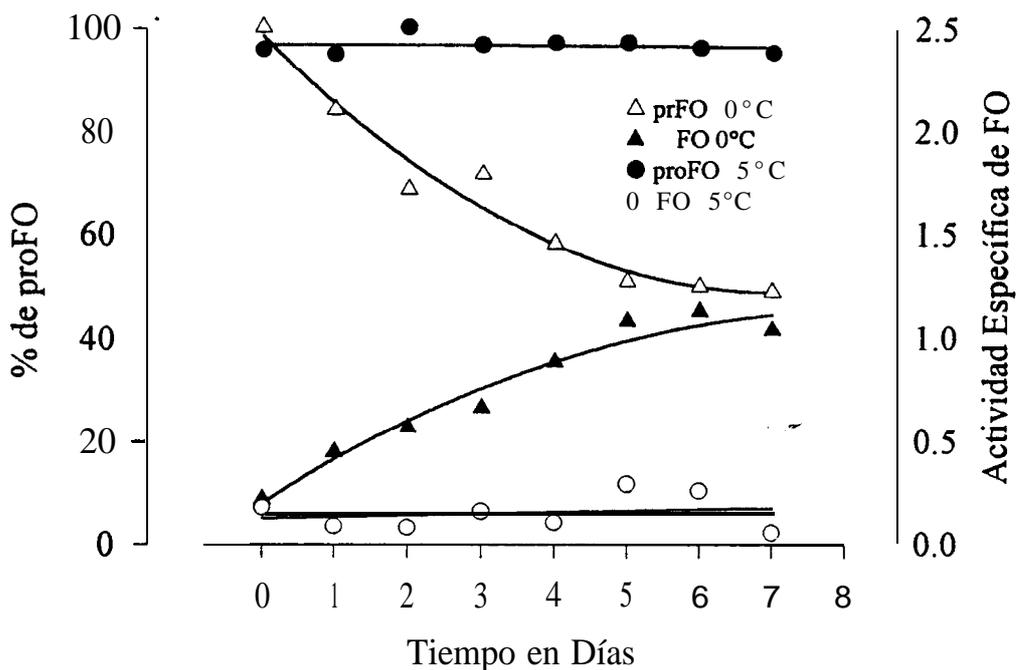


Fig. 2 Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad de la proFO de muestras obtenidas por centrifugación. LOS triángulos representan la incubación a 0°C y los círculos la incubación a 5°C.

Participación del calcio en la activación del sistema proFO

Debido a que la activación espontánea producida en las preparaciones de proFO de camarón café ha sido asociada a la presencia de calcio (Hernández-López, 1996), se probó la obtención del sistema proFO en soluciones libres de este catión. En la tabla 3 se aprecia que en ausencia de calcio se obtienen preparaciones con un bajo porcentaje de FO. Esto indica que el calcio tiene efecto en la activación espontánea de la proFO del camarón café. Sin embargo, por el beneficio de la utilización de la melitina, se probó además, el efecto conjunto de la melitina y la ausencia de calcio en la obtención de las proFO. Los resultados obtenidos indican que la ausencia de calcio permitió estabilizar el sistema y que la melitina no mostró un efecto adicional (Tabla 3). Por ello, en

los siguientes ensayos la muestra se obtuvo en un amortiguador de cacodilatos sin calcio y sin melitina.

Las muestras obtenidas en ausencia de calcio pudieron ser activadas posteriormente por adición de 50 mM de calcio. El porcentaje de activación inducida por este catión fue aproximadamente del 50% ± 3% respecto al porcentaje de activación obtenido por **incubación** con tripsina.

Tabla 3: Efecto del calcio durante la obtención de la proFO. Los valores están expresados en porcentaje relativo.

| | FO | proFO |
|---------------------------|--------------------|---------------------|
| Cacodilatos-Ca | 22.7 ± 0.48 | 77.33 ± 1.13 |
| Cacodilatos-Ca+Mel | 10.9 ± 1.2 | 89.1 ± 2.5 |
| Cacodilatos | 10.6 ± 0.9 | 89.4 ± 3.5 |
| Cacodilatos-Mel | 11.5 ± 0.9 | 88.5 ± 1.1 |

Activación por compuestos químicos

La activación de la profenoloxidasa en el extracto crudo por algunos compuestos **comunmente** utilizados en procesos de purificación de proteínas, se evaluó incubándolos durante **30 min**, **con muestras** que contenían proFO. Agentes caotrópicos como urea y guanidina y detergentes como Tween 20 y Triton X100 no activaron la proFO. Sin embargo el SDS y los solventes orgánicos probados (acetona, etanol y metanol) produjeron una activación significativa ($p < 0.05$) de la proFO (tabla 4).

Tabla 4: Activación de la proFO con diferentes compuestos. Las muestras fueron incubadas con cada compuesto durante 30 min. Los valores son expresados en actividad específica ($\Delta\text{Abs}/\text{min}/\text{mg}$) utilizando L-DOPA como sustrato. Se incluye el índice de activación considerando el control como 1.

| ACTIVADOR | Actividad. Específica. | Índice de activación | |
|---------------------|------------------------|----------------------|---|
| Detergentes | | | |
| SDS (1 %) | 1.10 ± 0.05 | 10 | |
| Tween 20 (1 %) | 0.12 ± 0.03 | 1.09 | |
| Triton 100x (1 %) | 0.10 ± 0.01 | 0.9 | |
| Agentes caotrópicos | | | |
| Guanidina (10 mM) | 0.14 ± 0.06 | 1.27 | |
| Urea (10 mM) | 0.08 ± 0.01 | 0.72 | |
| Solventes | | | |
| Acetona | 1.64 ± 0.05 | 14.9 | |
| Metanol Absoluto | 0.94 ± 0.07 | 8.5 | |
| Etanol Absoluto | 0.51 ± 0.09 | 4.6 | |
| Control | Agua | 0.11 ± 0.02 | 1 |

Mecanismo de activación de la proFO

Siguiendo la hipótesis de que el calcio actúa en el proceso de proteólisis (Gollas-Galván et al., 1996), se realizó el siguiente experimento: muestras de proFO obtenidas por centrifugación se incubaron con un inhibidor de soya específico para serin-proteinasas (STI). Posteriormente se incubaron con calcio, SDS o etanol. Como se puede apreciar en la figura 3, el STI inhibe

significativamente ($P < 0.5$) la activación espontánea inducida por calcio hasta en un 80 %. Por su parte, **STI** no fue capaz de inhibir la activación producida por SDS o etanol, lo cual permite suponer que el calcio actúa sobre la enzima activadora (la cual es una proteinasa) más que sobre la **proFO** directamente. Adicionalmente, éstos resultados apoyan la idea que, durante la obtención de las muestras por centrifugación, junto con la **proFO** también se libera la enzima activadora.

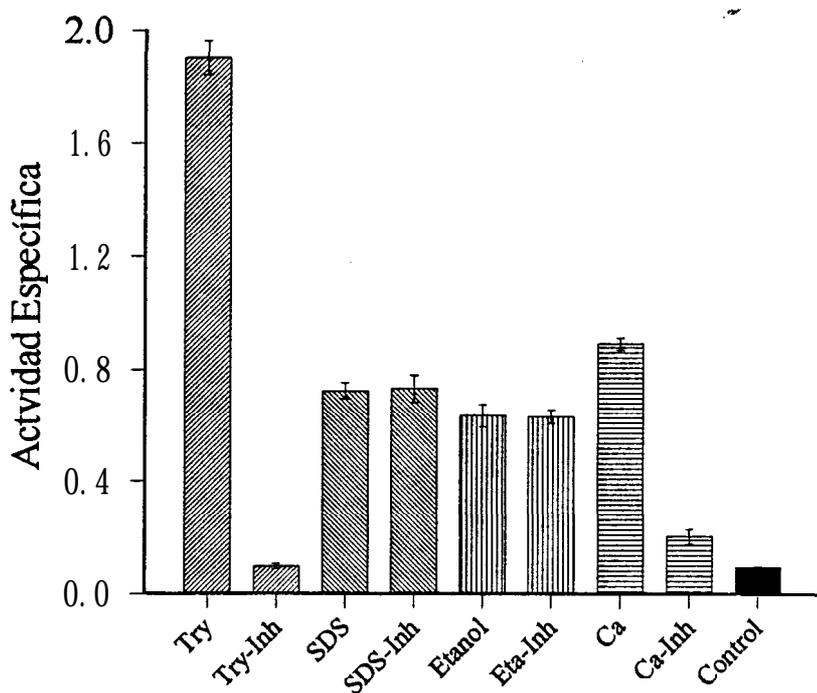


Fig. 3 Efecto del inhibidor de proteasas (**STI**) sobre la activación de la **proFO** con diferentes compuestos, usando cacodilatos como control. Los valores son la media de tres determinaciones.

Purificación de la **proFO**.

Blue Sepharose™ ha sido utilizada para la purificación de la **proFO** de *Pacifastacus leniusculus* y de *Blaberus discoidalis* (Aspán y Söderhäll, 1991; Durrant *et al.*, 1993). Siguiendo esta metodología se hizo un ensayo preliminar para ver la posibilidad de incluir este procedimiento para las muestras de camarón café, aplicando una muestra del centrifugado de hemocitos del camarón café a una columna de 1 mL de **Blue Sepharose™** y se pudieron obtener dos pico de proteína; en una de ellas se detectó **proFO**.

Por otro lado, a pesar de que los hemocitos se lavaron, antes de centrifugarlos para inducir la degranulación y obtener la **proFO**, uno de los principales contaminantes en las muestras fue la hemocianina. En un intento de eliminar esta proteína por sedimentación, la muestra se centrifugó a 70,000 g por 14-16 hrs a 4°C. Desafortunadamente, al ultracentrifugar la muestra conteniendo **proFO** de hemocitos del camarón café, la hemocianina y la **proFO** sedimentaron conjuntamente, haciendo imposible su separación. Sin embargo, la ultracentrifugación permitió concentrar la muestra de **proFO**, al mismo tiempo que se logró eliminar algunas proteínas contaminantes.

Tomando en cuenta lo anterior se estableció un protocolo para la purificación de la **proFO** del camarón café, el cual consistió en dos procesos: pasar la muestra a través de una columna de **Blue-Sepharose** de 11 x 1 cm equilibrada con cacodilatos 10 mM y ultracentrifugando. Las fracciones con mayor contenido de **proFO** obtenidas de la columna (tubos No. 12, 13 y 14) (figura 4), se mezclaron y se ultracentrifugaron. Se tomó 1 mL del fondo del tubo y se determinó su contenido de **proFO** y proteína total

Los resultados del proceso de purificación son resumidos en la tabla 5. Con la utilización de la columna de **Blue-Sepharose** se eliminaron algunas de la proteínas contaminantes, principalmente la proteasa activadora y quedando residuos de hemocianina como única proteína contaminante. Con este proceso se obtuvo un rendimiento del 62% en la purificación.

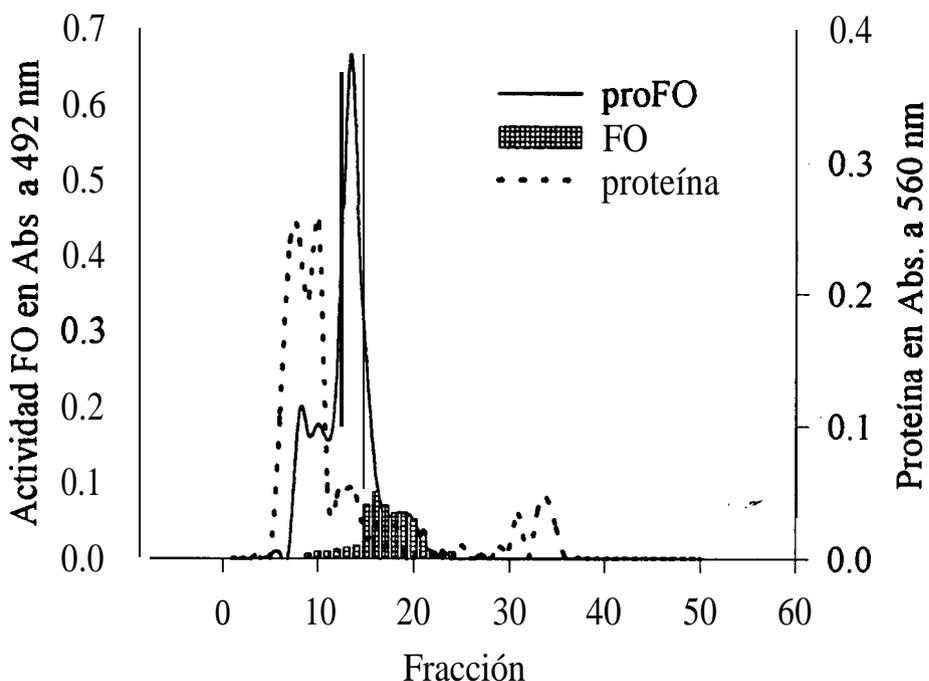


Fig. 4 **Cromatografía** de **proFO** en Blue-Sepharose. Se aplicó 1 mL de muestra y se eluyó con amortiguador de cacodilatos 10 mM pH 8. Se colectaron fracciones de 1 mL.

La funcionalidad de la **proFO** purificada, se verificó por su capacidad enzimática, después de activarla proteolíticamente con tripsina. La actividad enzimática de la FO, convertida por el tratamiento con tripsina, es tomada como 100% para reportar las actividades relativas.

Activación de la **proFO**

Mientras que el centrifugado de hemocitos es activado con calcio, las fracciones con **proFO** eluidas de la columna no pudieron ser activadas por la presencia de este catión. Aunque no se probó la actividad de proteasa en las fracciones del segundo pico de proteína de la columna de Blue-Sepharose (Fracciones 30-36), de acuerdo a la literatura (Aspán et al., 1990) es posible que ahí se encuentre la enzima activadora de la **proFO**. Esto podría explicar la falta de activación por calcio en las fracciones eluidas y al mismo tiempo refuerza la idea que el calcio

actúa sobre la E_AproFO. Por otro lado, los LPS y la laminarina no pudieron activar las muestras eluidas de la columna de Blue-Sepharose (tabla 6), lo que sugiere la necesaria presencia de todos los componentes del sistema para su activación.

Tabla 5: Rendimiento en la purificación de la proFO.

| | Vol (ml) | Proteína(mg/ml) | Actív. (D.O.) | Actív. Espec. | Rendimeínto % |
|---------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Inicial | 3.6 | 0.60 | 1.20 | 4.0 | 100 |
| Ultracentrifugación | 1.2 | 0.50 | 1.40 | 5.6 | 117 |
| Blue Sepharose | 3.0 | 0.14 | 0.66 | 9.8 | 57 |
| Ultracentrifugación | 1.2 | 0.13 | 0.75 | 11.5 | 62 |

Tabla 6: Activación de la proFO con diferentes compuestos biológicos. Se incluye el índice de activación considerando el control como 1.

| Activador | Actividad Relativa | Índice de Activación |
|----------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Control | 1.50 ± 0.05 | 1 |
| LPS | | |
| <i>E. coli</i> | 1.33 ± 0.02 | 0.88 |
| <i>V. cholerae</i> | 1.46 ± 0.13 | 0.97 |
| <i>P. Aeruginosa</i> | 1.23 ± 0.04 | 0.82 |
| Laminarina | 1.08 ± 0.02 | 0.72 |
| Tripsina | 9.62 ± 0.46 | 6.4 |

Algunos autores han reportado que el calor es capaz de activar a la **proFO** (Ashida y **Söderhäll**, 1984). Por ello, se determinó el efecto de la temperatura en la activación de la **proFO** del camarón café, donde las muestras de **proFO** fueron incubadas 30 min a diferentes temperaturas (25, 36, 40, 50, 60 y 70°C). Posteriormente se determinó la actividad de FO generada. De acuerdo a la tabla 7, no existe activación de la **proFO** por efecto de la temperatura de incubación. Solamente se observó una ligera activación (2%) de la **proFO** a 70°C; sin embargo ésta no fue estadísticamente significativa, respecto al control (25°C).

Tabla 7: Efecto de la la temperatura como activador de la **proFO**

| Temperatura (°C) | Actividad Específica ΔAbs/min/mg |
|-------------------------|---|
| 25 | 0.359 \pm 0.0274 |
| 36 | 0.357 \pm 0.0339 |
| 40 | 0.349 \pm 0.0089 |
| 50 | 0.350 \pm 0.0129 |
| 60 | 0.346 \pm 0.0323 |
| 70 | 0.367 \pm 0.0347 |

Determinación de la masa molecular relativa

Durante las electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en presencia de SDS se observó una agregación de la proteína manifestándose algunos problemas durante el corrimiento. Se probaron diferentes concentraciones de

acrilamida (12, 10 y 7.5%), encontrándose que los geles al 7.5% son los adecuados para este tipo de muestras.

Un inconveniente que se esperaba en la determinación de la masa molecular era la agregación de la FO debido a que el SDS activa la **proFO**. Esta al desplazarse en el gel se agregaba provocando confusión en la determinación de la masa molecular. Sin embargo, al realizarse electroforesis en geles nativos (Figura 6D) no se observó presencia de agregados. Además, se corrieron muestras de **proFO** previamente incubadas con SDS y no se encontraron cambios en la masa molecular. Por el contrario, si la muestra es activada por proteólisis (activación con tripsina), hay cambios en las masas moleculares relativas. Además el porcentaje de activación de la **proFO** por el SDS es 35% aproximadamente (Tabla 4), por lo que aún puede ser detectada como **proFO**.

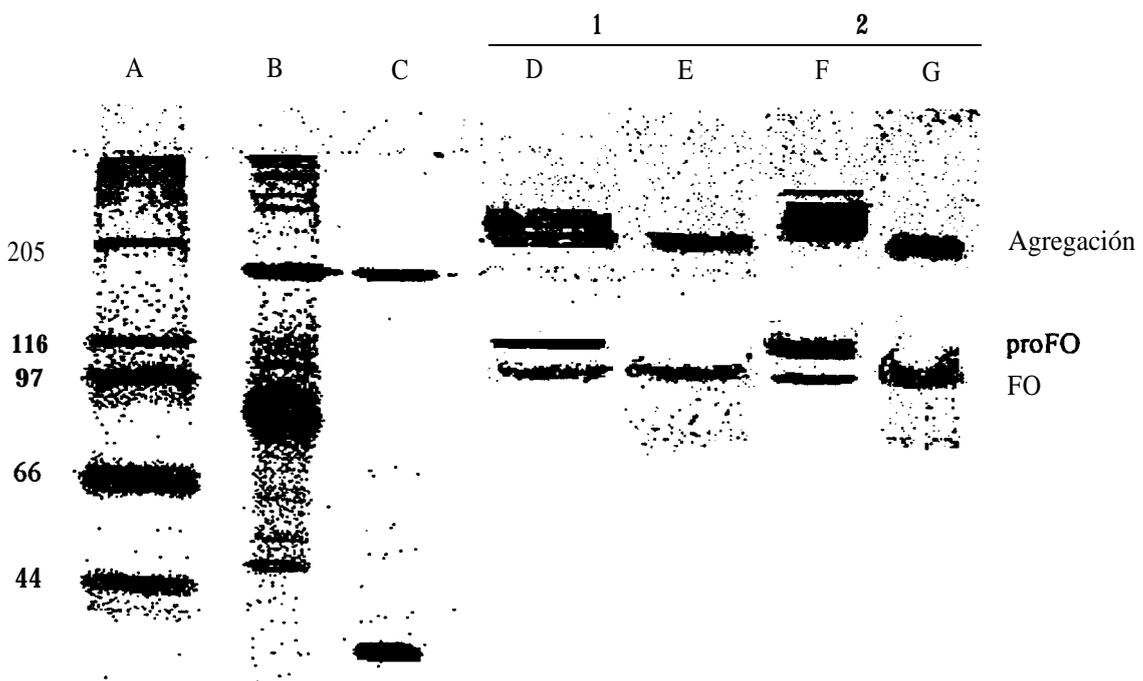


Fig. 5 Electroforesis-SDS de la **proFO** y FO en geles de acrilamida a 7.5%. Se usó tinción de Coomassie (A,B,C) y revelado por actividad (D,E,F y G). (A) Marcadores de peso molecular, (B,D,F) Muestra de **proFO**, (C,E,G) Muestra preincubada con tripsina. (1) Gel incubado con DOPA, (2) gel incubado con tripsina y DOPA.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo determinar que en condiciones **desnaturalizantes**, la masa molecular de la **proFO** es de 113.9 kDa y para la FO es de 106.6 kDa (Figura 5). Por su parte, en geles nativos la masa molecular encontrada fue de 272 y 170 kDa para la **proFO** y FO, respectivamente (Figura 6).

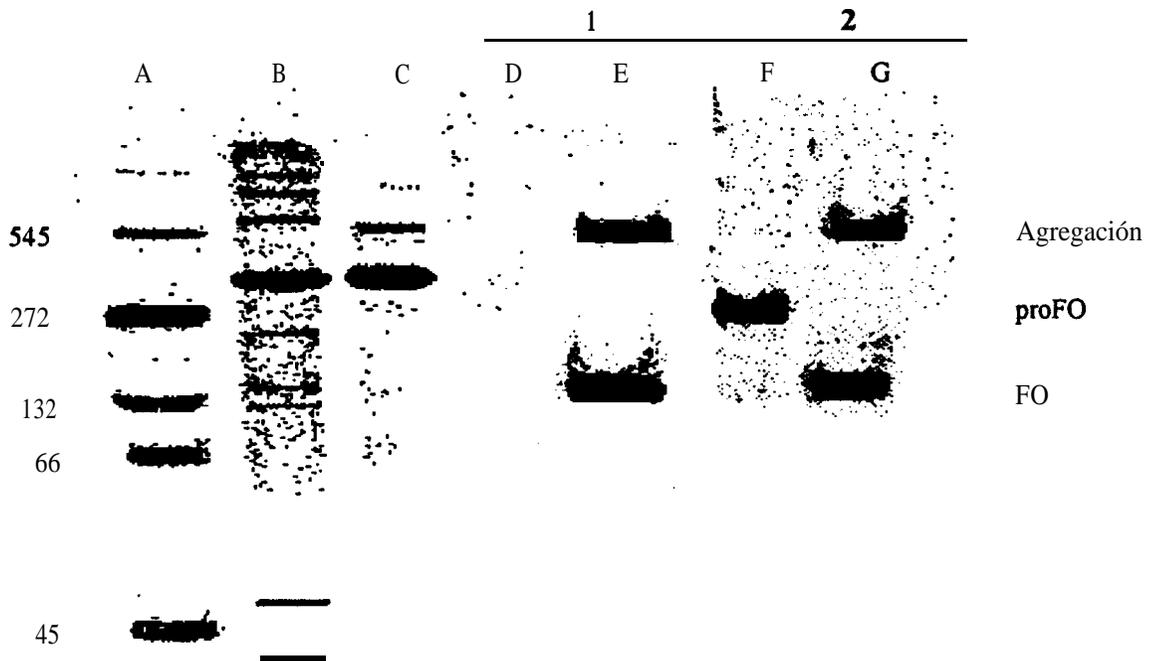


Fig. 6 Electroforesis nativa de la **proFO** y FO en geles de acrilamida a 7.5%. Se usó tinción de **Coomassie** (A,B,C) y revelado por actividad (D,E,F y G). (A) Marcadores de peso molecular, (B,D,F) Muestra de **proFO**, (C,E,G) Muestra preincubada con tripsina. (1) Gel incubado con DOPA, (2) gel incubado con tripsina y DOPA.

Punto isoeléctrico

Se determinó el punto isoeléctrico (pI) de ambas formas de la proteína (**proFO** y FO) en placas de poliacrilamida, detectándola por tinción de proteínas con plata y por actividad enzimática. La FO se obtuvo incubando previamente la **proFO** con tripsina (0.1 mg/mL) antes de aplicarse al gel. Para detectar la **proFO**,

después de la electroforesis el gel se incubó previamente con tripsina 0.1 mg/mL durante 15 min a temperatura ambiente. De acuerdo a la curva elaborada con estándares de pI conocido, el pI obtenido para ambas formas (proFO y FO) es de 7.35 (Figura 7).

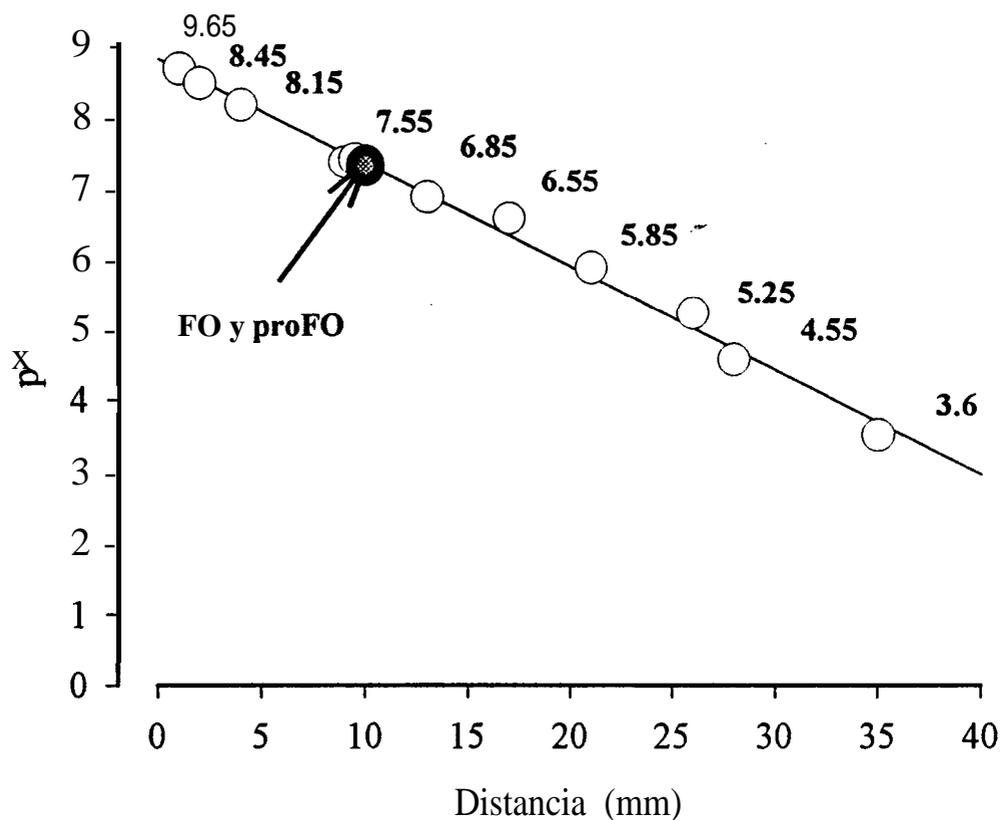


Fig. 7 Curva estándar realizada para la determinación del pI de la fenoloxidasas y la profenoloxidasas.

Efecto de la temperatura en la proFO y FO

Se determinó el efecto directo de la temperatura sobre la desnaturalización de la proFO y de la FO, usando este procedimiento, se pudo observar una importante disminución de la proFO disponible por efecto de la temperatura, como se puede apreciar en la figura 8. De acuerdo a estos resultados, la proFO

es una proteína **termolábil** que se desnaturaliza y no puede ser posteriormente activada por un tratamiento con tripsina.

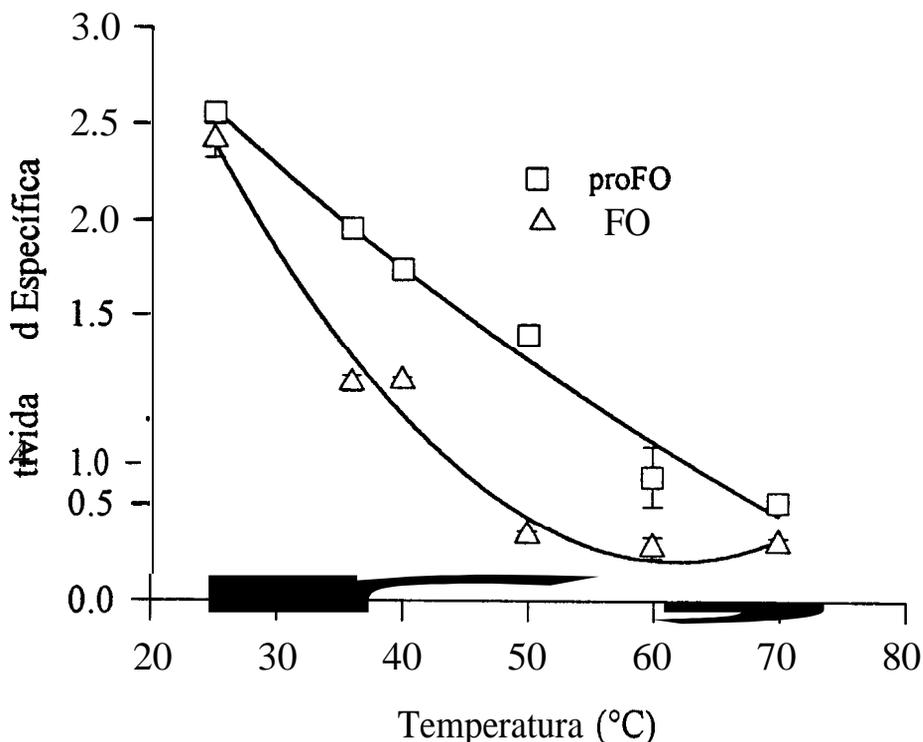


Fig. 8 Efecto de la temperatura sobre la proFO y la FO.

Para determinar el efecto de la temperatura en la FO, la enzima se incubó a diferentes temperaturas. Se observó una pérdida de actividad al aumentar la temperatura (Figura 8). Lo anterior confirma que ambas formas, la proFO y la FO del camarón café son termosensibles.

Otra de las determinaciones que se hicieron fue el efecto del tiempo de incubación a 58°C sobre la proFO y la FO. Para la proFO, después de la

incubación a esta temperatura, se intentó la activación con tripsina de la forma acostumbrada. La capacidad de la **proFO** para transformarse en enzima **activa** debido al **tratamiento** con tripsina disminuye rápidamente, detectándose una **reducción** del **85%** en los primeros 3 min de incubación. El **15%** restante se mantiene durante todo el período de incubación (Figura 9).

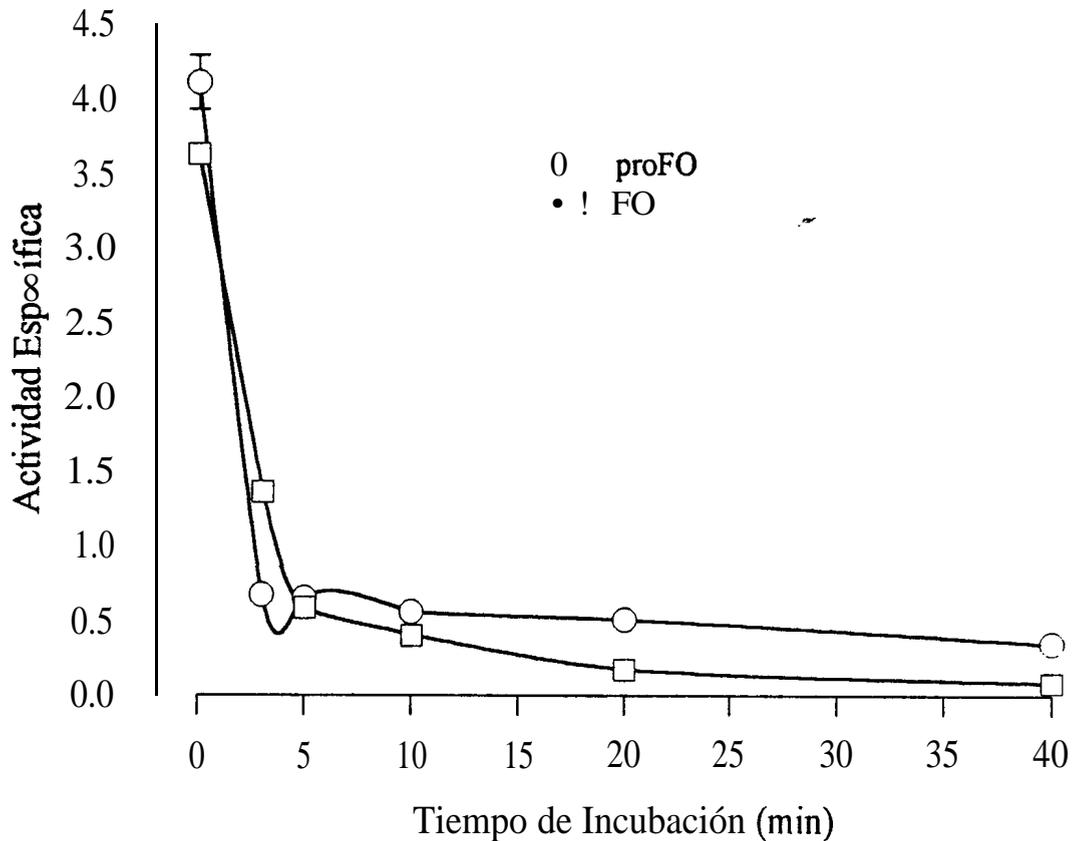


Fig. 9 Efecto de diferentes tiempos de incubación a 58°C sobre la FO y proFO. Los resultados son la media de tres determinaciones.

Además, en la incubación a 58°C, se observó una inactivación tanto de la FO como de la proFO desde los primeros 3 min de incubación y continuó disminuyendo con el tiempo de incubación, hasta su total inactivación cerca de los 20 min (Figura 9).

Efecto del pH sobre la reacción de la FO

Las muestras de FO se incubaron durante 30 min a 25°C con cada pH y posteriormente se determinó la actividad de esta enzima utilizando L-DOPA como sustrato. Los resultados mostraron que existe una importante inhibición de la formación del dopacromo a pHs entre 3 y 5, mientras que a pH de 6 se observó un 50% de actividad respecto al valor más alto, el cual se logró a pH de 8. Considerándose éste como el pH óptimo de la reacción (Figura 10)

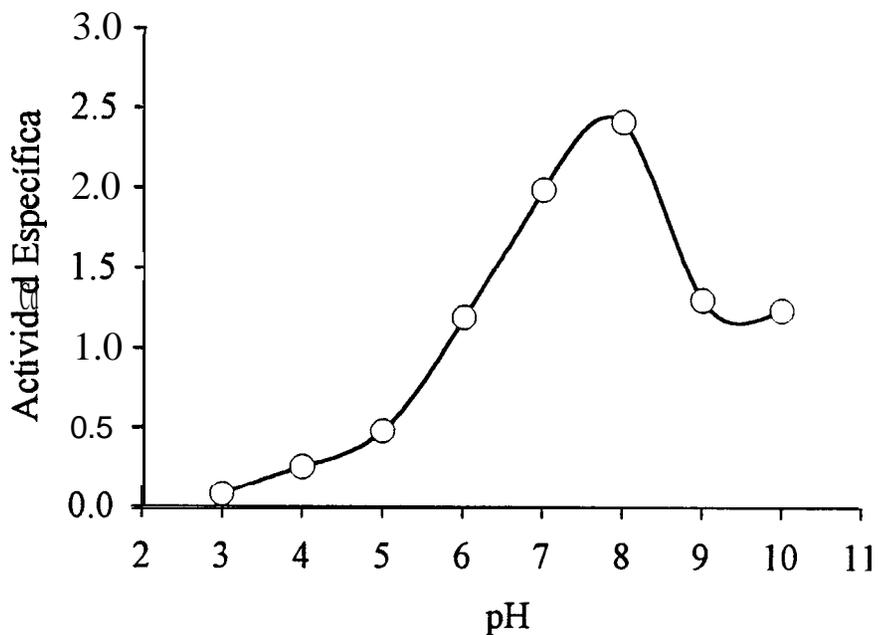


Fig. 10 Efecto del pH sobre la fenoloxidasas. Los valores son las medias de tres determinaciones.

A pH de 9 y 10 se observó un incremento en la densidad óptica indicando una aparente elevación en la actividad. Sin embargo, a estos pHs existe una autooxidación del sustrato. Esto fue puesto de manifiesto incubando el sustrato

sin la enzima a pH 9 y 10, observándose una oxidación. Por esta razón se restó el valor de los **controles** a los valores obtenidos con la enzima (Figura 10).

Prueba de inhibidores de la fenoloxidasasa

También se determinó la capacidad de algunos probables inhibidores de la reacción de la FO. La prueba se realizó incubando 50 μL de FO (generada de la **proFO** por incubación con tripsina) con 50 μL de inhibidor (10 **mM**) durante 30 min y determinándose la actividad FO residual. Se encontró que la feniltiourea y el EGTA no inhiben significativamente la FO, **mientras** que la azida produce una inhibición mínima, pero estadísticamente significativa ($p > 0.05\%$). La tiourea y el EDTA inhibieron la FO en un 55 y 40 %, respectivamente. La mayor inhibición fue provocada por el ADTC y por el cobre (Figura II). La inhibición por cobre se corroboró probando diferentes concentraciones de este ion, encontrándose que es capaz de inhibir desde 5 **mM**.

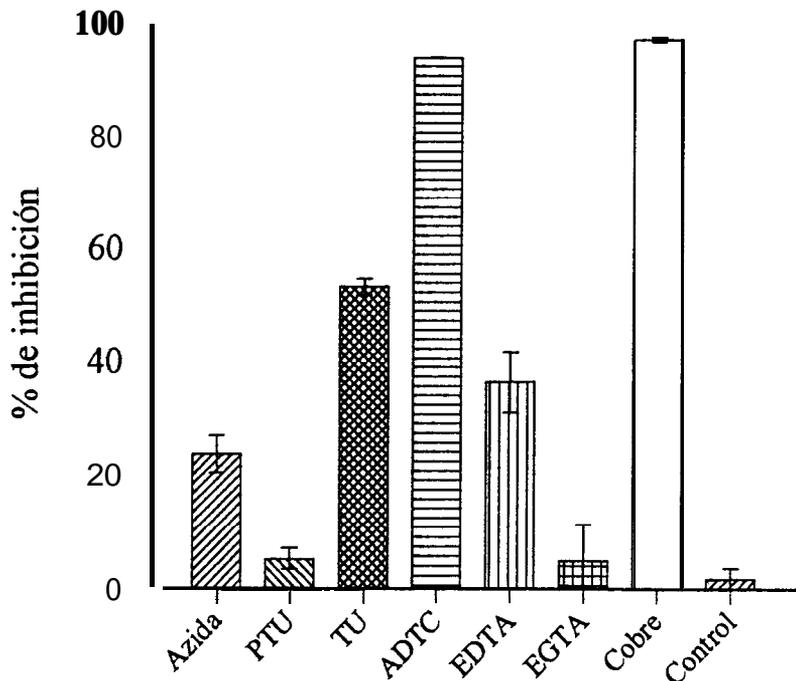


Fig. II Ensayo de inhibición de la FO. Los resultados son la media de triplicados.

Estos datos se confirmaron al determinar la velocidad de reacción (Tabla 8), la cual se realizó midiendo la cinética enzimática de la FO en presencia del inhibidor, utilizando un espectrofotómetro Beckman **DU-600**. El efecto se determinó observando el cambio en la pendiente de la cinética de la reacción al adicionar el inhibidor después de 5 **min** de iniciada la reacción.

Tabla 8: Efecto de los inhibidores en la velocidad de la reacción de la FO definida como cambio de **absorbancia/minuto**.

| Inhibidor | Velocidad |
|---------------------------|------------------------|
| Azida | 0.0342 ± 0.0029 |
| Feniltiourea | 0.0485 ± 0.0107 |
| Tiourea | 0.0121 ± 0.0017 |
| Ac. ditiocarbámico | 0.0037 ± 0.0004 |
| EDTA | 0.0376 ± 0.0021 |
| EGTA | 0.0483 ± 0.0034 |
| Cu⁺⁺ | 0.0001 ± 0.0001 |
| Control | 0.0499 ± 0.0025 |

Especificidad de la FO

La especificidad de la FO del camarón café se investigó probando diferentes sustratos reportados en la literatura (Thangaraj et al., 1990; Aspán et al., 1995). Debido a que cada **sustrato** mostró diferente color al ser transformados por la FO del camarón café, se determinó la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) de cada uno de los productos. Fueron dos las diferentes $\lambda_{\text{máx}}$ encontradas (410 y 490 nm), como se puede apreciar en la tabla 9. Así, el producto de la reacción para cada **sustrato** se midió en su correspondiente $\lambda_{\text{máx}}$.

Tabla 9: Longitud de onda de máxima absorción (λ máx) de los **sustratos** utilizados.

| SUSTRATO | λ máx (nm) |
|-----------------|--------------------|
| L-DOPA | 490 |
| Hidroquinona | 490 |
| Fenol | 490 |
| Tirosina | 490 |
| Tiramina | 410 |
| Catecol | 410 |
| Metilcatecol | 410 |
| Resorcinol | 410 |

Para determinar la especificidad de la FO de camarón por diferentes sustratos se determinó la K_m y la velocidad máxima y de acuerdo a los resultados observados en la tabla 10, la FO del camarón café tiene mayor especificidad por la L-DOPA (Figura 12) que por los otros sustratos probados. La FO de camarón tiene la capacidad de oxidar sustratos como el catecol y el metilcatecol aunque existe menor especificidad por estos . La tirosina también es oxidada por la FO, aunque más lentamente que la L-DOPA.

Tabla 10: Km y velocidad máxima de la FO, con diferentes sustratos

| Sustrato | Km (mM) | V _{máx} ΔAbs/min |
|-----------------|---------|---------------------------|
| L-Dopa | 2.3 | 1.29 |
| Metilcatecol | 2.53 | 0.83 |
| Catecol | 2.89 | 0.48 |
| Tirosina | 4.15 | 0.21 |
| Tiramina | 5.23 | 0.099 |
| Fenol | 3.92 | 0.007 |
| Hidroquinona | 10.5 | 0.006 |
| Resorsinol | 13.3 | 0.004 |

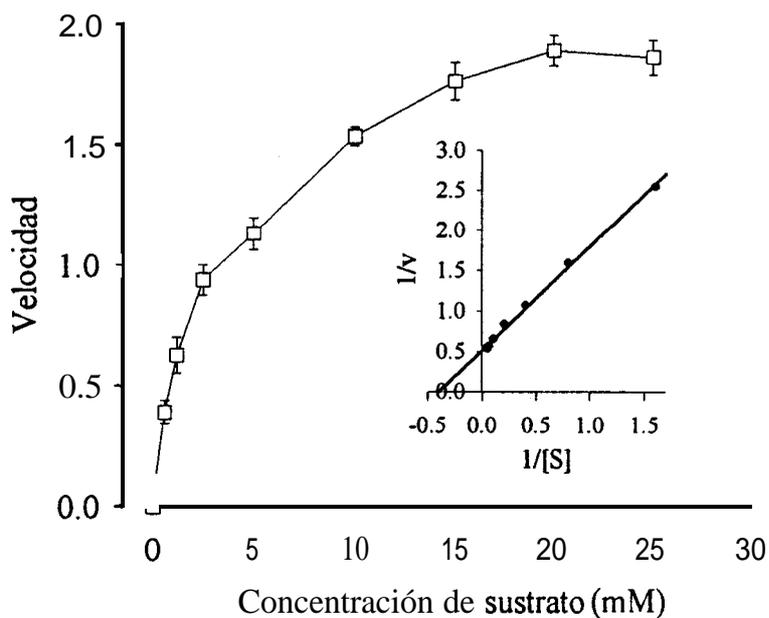


Fig. 12 Determinación del Km y Velocidad máxima de la FO usando L-DOPA como sustrato. La velocidad se expresa como el cambio de absorbancia por mg de proteína por minuto. Los resultados son la media de tres determinaciones.

Discusión

La importancia de la **proFO** en el sistema de defensa de los invertebrados ha sido ampliamente documentada (Ashida y Söderhäll, 1984; Lackie, 1988; Johansson y Söderhäll, 1989b; Ashida, 1990; Ashida y Yamazaki, 1990; Söderhäll et al., 1990; Ratcliffe et al., 1991; Söderhäll, 1992; Söderhäll et al., 1994). En insectos se ha demostrado la presencia de esta enzima en **forma** de zimógeno tanto en el plasma como en el interior de los hemocitos (Saul y Sugumaran, 1987; Saul y Sugumaran, 1988; Ashida, 1990; Ashida y Yamazaki, 1990), encontrándose en mayor cantidad en el plasma (Leonard et al., 1985a; Ashida y Yamazaki, 1990). Por ello, para el aislamiento de la **proFO** de insectos se ha utilizado como fuente el plasma libre de células (Andersson et al., 1989; Ratcliffe y Gotz, 1990; Nappi y Seymour, 1991; Brivio et al., 1992; Lockey y Ourth, 1992). Sin embargo, en crustáceos, la **proFO** solo ha sido detectada en los hemocitos (Ashida y Söderhäll, 1984; Leonard et al., 1985a; Ashida et al., 1988; Ratcliffe y Gotz, 1990), por lo que para su aislamiento en estos organismos se ha utilizado el sobrenadante de un **lisado** de hemocitos (Aspán y Söderhäll, 1991; Lanz et al., 1993; Aspán et al., 1995).

En el camarón café la **proFO** se encuentra confinada en el interior de los hemocitos (Vargas-Albores, 1992; Hernández-López, 1996), y siguiendo la metodología descrita para otros crustáceos se intentó su aislamiento a partir de hemocitos. Sin embargo, cuando se implementó la metodología de obtención de la **proFO** a partir de un **lisado** de hemocitos se observó alto porcentaje de activación espontánea (Tabla 1). En cambio, utilizando otra metodología, la cual consiste en resuspender los hemocitos en soluciones con baja salinidad y seguido de centrifugación a alta velocidad (Hernández-López et al., 1996), fue posible obtener preparaciones con alto contenido de **proFO** reduciendo la activación espontánea además de eliminar la contaminación por otras proteínas citoplasmáticas no relacionadas con el sistema, como ocurre cuando se utiliza SLH.

Debido a que para la purificación de la **proFO** se requiere la proenzima en forma inactiva, la técnica de obtención por centrifugación resultó más eficiente, ya que la **activación** espontánea fue significativamente menor que cuando se utilizó SLH. Sin embargo, a pesar de que los resultados obtenidos al utilizar el método de centrifugación fueron aceptables, las muestras tenían que ser trabajadas inmediatamente, debido a que continuaban activándose en forma espontánea. De este modo, a las 48 horas después de **obtenida** la muestra y mantenida en refrigeración, se observaba casi un 50% de activación espontánea.

El fenómeno de activación espontánea de la **proFO** ha sido reportado, incluso desde el proceso de obtención de la hemolinfa en *Bombyx mori* (Ashida et al., 1983; Ashida y Yamazaki, 1990), *Blaberus craniifer* (Leonard et al., 1985b), *Heliothis virescens* (Lockey y Ourth, 1992), *Drosophila melanogaster*, *Locusfa migratoria* y *Austropotambius pallipens* (Nappi et al., 1991; Nappi y Seymour, 1991). En *Bombyx mori* se logró evitar la activación espontánea utilizando un factor de caña de azúcar, el cual mostró ser un eficiente supresor de la activación del sistema **proFO** (Ashida, 1981). Sin embargo, algunos azúcares, así como el factor de la caña de azúcar pueden causar degranulación y liberación del sistema **proFO** en el plasma, razón por la cual no se utilizó éste en la obtención de la **proFO** de camarón café.

Aunque la posible causa de activación espontánea era la presencia de la proteasa activadora de la **proFO** (Aspán et al., 1990), en este trabajo, se evitó la utilización de inhibidores de proteasas, como el PMSF, para la obtención de **proFO** estable. Esto se debió principalmente a que el PMSF necesita ser disuelto en solventes orgánicos y se tenían antecedentes de que los solventes orgánicos son capaces de activar la **proFO** (Brehélin et al., 1989; Lockey y Ourth, 1992). Por otro lado, la utilización de inhibidores de proteasas dificultan la determinación posterior de la **proFO**, ya que se requiere convertirla a su forma activa por **proteólisis** enzimática con tripsina.

Söderhäll (1985) demostró que la **melitina**, un inhibidor de proteasas obtenido del veneno de abeja, evita la activación espontánea de la **proFO**. Este inhibidor fue utilizado para el aislamiento y durante los procesos de purificación de la **proFO** de langostino. A diferencia de otros inhibidores de proteasas, la **proFO** obtenida con **melitina** puede ser activada posteriormente (Aspán y Söderhäll, 1991), por lo que representa una buena opción para utilizarse durante los procesos de purificación de la **proFO**.

El uso de la **melitina** durante la obtención de la **proFO** del camarón café, permitió la recuperación de una muestra de **proFO** estable, sin inhibir la transformación posterior de **proFO** a FO a través de **proteólisis** con tripsina. El uso de **melitina** también permitió que la muestra permaneciera estable por lo menos durante un período de 48 horas en que fueron monitoreadas tanto la actividad FO como la presencia de **proFO** (Figura 2). Aunque la **melitina** permite mantener las muestras estables durante 7 días a 5°C, no tiene efecto protector a 0°C. Si bien en la bibliografía no se ha reportado ningún efecto de este tipo, se presume que la activación de la muestra se debió a la congelación.

Por otro lado, el calcio tiene un papel importante durante la activación de la **proFO** del camarón **cefé** como se logró demostrar en este trabajo. Esto ayuda a explicar la activación espontánea observada en extractos crudos de **proFO**, donde también se encuentran otros componentes del sistema **proFO**, como la EAprFO (Ashida et al., 1983; Leonard et al., 1985b; Aspán y Söderhäll, 1991). Esta conclusión se basa en que, en muestras crudas de **proFO** el calcio induce una activación espontánea significativa, sin embargo este fenómeno puede ser inhibido por **melitina** y por **STI**. Por último debe recordarse que en muestras de **proFO** libres de EAprFO (obtenida por Blue-Sepharose) no se aprecia activación espontánea en presencia de calcio. Esta observación soporta la hipótesis de que el calcio participa en la activación de la EAprFO más que en la **proFO** directamente.

Resultados semejantes, aunque no concluyentes, han sido reportados en otros artrópodos, observándose además que la adición de calcio en SLH de insectos

(Ashida y Yamazaki, 1990) y crustáceos (Söderhäll y Hall, 1984; Kobayashi et al., 1990) aumenta la actividad de proteasas. Sin embargo, la participación del calcio en la estabilidad de la **proFO** parece ser controversial. En la langosta (Ashida y Söderhäll, 1984) así como en *Schistocerca* gregaria (Dularay y Lackie, 1985) la ausencia de calcio evita la activación espontánea de la **proFO** y se requieren bajas concentraciones (5 mM) para provocar su activación de la misma manera que en el camarón café. En cambio se ha demostrado que en otros insectos y crustáceos, altas concentraciones de calcio (100-200 mM) estabilizan la **proFO** y evitan su activación espontánea (Ashida et al., 1983; Ashida y Söderhäll, 1984; Söderhäll y Hall, 1984; Leonard et al., 1985a; Leonard et al., 1985b; Johansson y Söderhäll, 1988; Kobayashi et al., 1990).

Hasta la fecha, el mecanismo de acción del calcio *no* había sido dilucidado. Roch et al., (1992), trabajando con un equinodermo (*Halotorula tubulosa*), obtienen evidencias para sugerir un modelo de transformación de **proFO** a FO. Ellos proponen que la **proFO** es convertida por una serin-proteinasa en un intermediario de 14.5 kDa que a su vez es polimerizado a un tetrámero de 60 kDa requiriendo calcio para su formación. Sin embargo, los mismos autores obtienen, aunque en menor grado, activación de la **proFO** por tripsina en ausencia de calcio. Este modelo es dudoso o al menos, no es aplicable en el camarón café donde es posible activar a la **proFO** con tripsina independientemente de la presencia de calcio.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir un posible mecanismo de activación del sistema **proFO** en el camarón, donde los hemocitos granulares o semigranulares, estimulados por compuestos biológicos de origen microbiano, liberan el sistema **proFO**. Debido a que dentro del granulo la concentración de calcio es insuficiente para la activación (0.015 mM), cuando el sistema **proFO** es liberado al plasma se encuentra con un medio que contiene la concentración molar de calcio (8.5 mM) suficiente para activar a la enzima activadora de la **proFO**, produciéndose en consecuencia, la activación de la **proFO**. Este modelo nos permite explicar también la razón por la que la **proFO** y la enzima activadora se encuentran coexistiendo en el gránulo citoplásmico sin

que exista activación, identificándose claramente dos eventos requeridos para la activación del sistema **proFO** en el camarón café: liberación del sistema y activación extracelular.

La proteólisis no es la única vía de activación de la **proFO** del camarón café, ya que algunos compuestos como detergentes y solventes son capaces de activar la proenzima (Tabla 4). Este fenómeno también ha sido reportado en otros organismos (Ashida y Söderhäll, 1984; Ratcliffe et al., 1985; Sugumaran y Nellaiappan, 1991). Durrant et al. (1993) sugieren que el **SDS** provoca un cambio conformacional quedando expuesto el sitio activo de la molécula, pero no explican el mecanismo. En forma similar la activación de la **proFO** también ha sido reportada en el langostino (Ashida y Söderhäll, 1984; Aspán y Söderhäll, 1991). Por su parte Sugumaran y Nellaiappan (1991) encontraron activación por detergentes **tales** como cetilpirimidinio además del SDS y no encontraron activación por tween 20 y tritón X100.

Aunque aún no se tiene claro el mecanismo de acción de los compuestos no proteolíticos, Preston y Taylor (1970) propusieron tres hipótesis para explicar la acción de los solventes orgánicos sobre la **proFO**: a) eliminación de inhibidores, b) **producción** de cambios químicos en la molécula, exponiendo el sitio activo, y c) agregación de subunidades las cuales forman la enzima activa. Sin embargo, respecto a la agregación de subunidades Ashida y Yoshida (1988) sugirieron que la agregación de moléculas de FO puede ser una consecuencia, más que la causa de activación. Por su parte Ashida y Söderhäll (1984) al encontrar activación por SDS en **hemocito** de langostino mencionan que estos factores podrían no estar actuando sobre la **proFO** directamente sino sobre componentes del sistema aún desconocidos. Uno de los componentes sobre los que podría tener efecto tanto el SDS como los solventes, es la **EAProFO**. Sin embargo, los resultados obtenidos en camarón café permiten asegurar que estos compuestos actúan directamente sobre la molécula de **proFO** ya que se obtiene activación aún cuando se inhibe la proteasa (Figura 3).

Además de aportar información importante sobre el mecanismo de activación de la **proFO** del camarón café, el definir la participación del calcio en el proceso, nos permitió **obtener** una muestra estable **susceptible** de trabajarse para lograr el aislamiento de la enzima en forma inactiva.

Antes de este conocimiento y en base a la literatura sobre purificación de la **proFO** de artrópodos (Aspán y Söderhäll, 1991; Durrant et al., 1993), se planteó un protocolo de purificación para la **proFO** de camarón café, el cual consistió en filtrar la muestra en una columna de Sephadex G-25 y posteriormente en una columna de Sepharose **6B**. Sin embargo, durante la filtración en Sephadex G-25 la **proFO** se activó y se adhirió al gel. Esto se debe a que la FO del camarón café es una proteína que se pega fácilmente a cualquier superficie (Vargas-Albores, 1992). La adherencia de la FO se ha observado en otros organismos tanto en insectos como en crustáceos (Söderhäll et al., 1986). Aunque la mayoría de los autores no lo mencionan directamente, algunos como Aspán y Söderhäll (1991) previnieron la adherencia utilizando **melitina** en todas las soluciones requeridas para la purificación de la **proFO** de hemocito de langostino. Durante la purificación de la **proFO** de hemocitos de cucaracha utilizaron altas concentraciones de calcio (35 mM) para estabilizar la **proFO** (Durrant et al., 1993). Por su parte, Roch et al., (1992) dicen que muchos intentos por caracterizar la **proFO** son frustrados por la activación espontánea.

Si bien la facilidad con que la enzima activada se pega a diferentes sustratos es una desventaja en los procesos de purificación; *in vivo* esta propiedad es importante para el organismo ya que le permite el aislamiento físico de material extraño, formando capas de **melanización** alrededor del patógeno (Söderhäll, 1982; Söderhäll et al., 1986; Johansson y Söderhäll, 1989b; Ashida y Yamazaki, 1990).

Por otro lado, Söderhäll et al., (1992) manifiestan la dificultad del estudio de esta enzima, no sólo por su facilidad de activación sino también por la poca cantidad que existe en los hemocitos de crustáceos. Esto fue evidenciado trabajando con camarón café ya que en los geles de poliacrilamida la banda

correspondiente a la enzima **proFO** no se pudieron teñir con Coomassie. Por ello se hizo **necesaria** la utilización de **tinción** con plata, la cual es más sensible y permite detectar cantidades menores de proteína (100 pg).

Un buen resultado en el proceso de purificación fue obtenido utilizando una columna de Blue-Sepharose (Tabla 5), donde el avance más importante fue la eliminación de la enzima activadora de la **proFO**. Aunque directamente no se detectó la actividad de proteasas, de manera indirecta se detectó su eliminación ya que al tratar con calcio las fracciones que contenían la **proFO**, no se observó activación espontánea. Resultados similares fueron obtenidos en **proFO** de hemocitos de langostino (Aspán y Söderhäll, 1991) y en **proFO** de hemocitos de cucaracha (Durrant et al., 1993).

Utilizando las muestras pasadas por Blue-Sepharose, se logró demostrar que la **proFO**, en ausencia de la enzima activadora, no puede ser activada por LPS ni laminarina, sugiriendo la necesaria presencia de todos los componentes del sistema para que sea posible la activación. Estos resultados apoyan la idea de que los mecanismos de regulación del sistema **proFO in vivo** son dirigidos contra la enzima activadora. Así mismo, la incapacidad de activación directa sobre la molécula de **proFO**, por compuestos de pared celular de microorganismos, puede ser aprovechada por aquellos organismos patógenos cuyos mecanismos de patogenicidad incluyen la producción de inhibidores de proteasas.

La masa molecular aparente de la **proFO** de camarón café en condiciones nativas fue de 272 kDa, mientras que en desnaturalizantes fue de 113.9 kDa, lo que podría sugerir que la enzima nativa está constituida por un dímero. Este resultado es comparable con lo obtenido en langostino, donde se encontró un peso molecular de 300 kDa en condiciones nativas (obtenido por filtración en gel), mientras que por electroforesis en condiciones desnaturalizantes encuentran una masa molecular de 76 kDa, proponiendo que la proteína nativa puede existir como un tetrámero (Aspán y Söderhäll, 1991).

Por otra parte la masa molecular de la FO en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes fue de 106.6 kDa. Esta disminución en la masa molecular, al pasar a la forma activa, manifestó que el proceso proteolítico elimina un pequeño péptido de aproximadamente 7.3 kDa. Aunque existen pocas especies donde se ha determinado la masa molecular de la proFO y de la FO, se sabe que el rango del péptido liberado, producto de la activación hidrolítica de la proFO, varía de 5 a 20 kDa. Por ejemplo en *Bombix mori* el péptido liberado es de 5 kDa (Ashida y Yamazaki, 1990), mientras que para *Blaberus craniifer* la proteólisis de la proFO de 76 kDa provoca la liberación de un péptido de 6 kDa (Durrant et al., 1993). Además del camarón café, el único crustáceo donde se ha determinado la masa molecular de la proFO de hemocitos es la langosta, La masa molecular de la proFO de este organismo es de 76 kDa y después del rompimiento proteolítico se produjeron 2 moléculas con masa molecular de 60 y 62 kDa. Ambas formas de la enzima mantienen actividad y el péptido liberado fue de 10 y 12 kDa, respectivamente (Aspán y Söderhäll, 1991).

Por otro lado, la proFO de camarón café no es activada por calor (Tabla 7), a diferencia de lo encontrado en *Astacus asfacus*. En este crustáceo incubaciones entre 50 y 70°C producen una activación de la proFO semejante a la producida por tripsina (Ashida y Söderhäll, 1984). Aunque en el camarón no se observó este fenómeno, no se puede negar que esta activación pudiera ocurrir, pero en los ensayos no se aprecia porque la temperatura afecta la actividad enzimática de la FO.

La masa molecular de la proFO reportada para otras especies de artrópodos es muy variable aún cuando se haya empleado el mismo método. Por ejemplo, en larvas de mosca doméstica es de 310 kDa (Yamaura et al., 1980) y en prepupas del mismo insecto la forma inactiva pesa 178 y la forma activa 340 kDa (Tsukamoto et al., 1988). Con esto y varios reportes más, Durrant et al., (1993) llegan a la conclusión de que *in vivo* la enzima podría existir como una proteína polimérica. Respecto a la forma activa, Aspán y Söderhäll (1991) mencionan que la variación se debe a la agregación de la enzima. Este fenómeno de

agregación fue observado también en la **proFO** de camarón café, manifestándose como pequeñas bandas en la parte superior de los geles de acrilamida (**Figura 5 y 6**).

La **proFO** y la FO del camarón café mostraron ser altamente sensibles a la temperatura. La FO es prácticamente desnaturalizada a temperaturas de **50°C**, semejante a lo encontrado para la FO de hemocitos de *Heliotis virescens* (**Lockey y Ourth, 1992**) y a la FO de cutícula de langostino, donde la enzima disminuye su actividad en un 50% a 35°C para casi desaparecer a los 45°C (**Opoku-Gyamfua et al., 1992**). Otro reporte que manifiesta la termolabilidad de la fenoloxidasa, es un trabajo realizado con la mosca doméstica, donde a temperaturas mayores de 60°C la actividad enzimática desaparece totalmente (**Hara et al., 1993**).

El pH juega un papel importante en el desarrollo de las reacciones enzimáticas. El pH óptimo para la reacción de la FO de camarón café utilizando L-DOPA como **sustrato** fue de 8. Sin embargo, para la FO de cutícula de langostino se ha observado un pH óptimo de 7 (**Opoku-Gyamfua et al., 1992**). En la mosca doméstica la FO presentó un rango de pH óptimo de 6 a 10 (**Hara et al., 1993**), mientras que en *Heliotis virescens* el pH óptimo para la FO se reportó en 9.5. En este último caso no se menciona si se realizaron controles sin enzima, lo cual es importante, ya que en los controles de nuestros experimentos se encontró que la L-DOPA presenta autooxidación a pH de 9 en adelante y tal vez este elevado valor reportado sea debido a la autooxidación y no a la oxidación realizada por la FO.

En insectos se han encontrado tres tipos de fenoloxidasa (**Barrett, 1987**): el tipo **laccasa** (E.C. 1.10.3.2; bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa), el tipo **catecol oxidasa** (E.C. 1.10.3.1; 1,2-bencenodiol: oxígeno oxidoreductasa) y el tipo **tirosinasa** (E.C. 1.14.18.1; dihidroxifenilalanina: oxígeno oxidoreductasa). Estas enzimas han sido reportadas en mayor cantidad en la cutícula y están involucradas en los procesos de esclerotización y **melanización** (**Andersen et al., 1992; Chen et al., 1992; Aspán et al., 1995**).

En la cutícula de crustáceos también existen estas 3 enzimas. (Chen et al., 1992). Sin embargo, en hemocitos solo se ha reportado la tipo tirosinasa (E.C. 1.14.18.1) (Aspán et al., 1995). En algunos trabajos sobre FO de crustáceos (Leonard et al., 1985a; Smith y Söderhäll, 1986; Ashida y Yamazaki, 1990), incluyendo camarón café (Vargas-Albores et al., 1993b) se ha referido a esta enzima como E.C. 1.10.3.1 o-difenoloxidasas. Para asegurar la clasificación de la enzima FO **obtenida** de hemocitos de camarón café se buscó su especificidad utilizando sustratos fenólicos. La FO del camarón café presentó capacidad para oxidar tanto monofenoles, como difenoles. Esto lo realiza hidroxilando lentamente los monofenoles (tirosina y tiramina) y oxidando o-difenoles (dihidroxifenilalanina, metilcatecol y catecol). Sin embargo la FO de camarón café fue incapaz de oxidar los **p-difenoles** probados, hidroquinona y resorcinol. Estos resultados hacen suponer que la FO de camarón café es una enzima tipo tirosinasa (E.C. 1.14.18.1) como la reportada en el langostino (Aspán et al., 1995).

La FO de camarón no es inhibida en un 100 % por el EDTA. Sin embargo en otros artrópodos como H. *virescens*, el EDTA es capaz de bloquear la actividad FO, la cual no puede ser restaurada ni aún adicionando altas concentraciones de calcio (Lockey y Ourth, 1992).

De igual forma, la feniltiourea no fue capaz de inhibir la FO de camarón café y aunque no ha sido probada en otros crustáceos, nuestros resultados son contradictorios a los reportados por Nayar y Bradley (1994) quienes encontraron una inhibición por feniltiourea de aproximadamente el 70% en la FO de hemocitos de *Aedes aegypti* y *Anopheles quadrylimatus*.

Sorpresivamente el cobre fue capaz de inhibir la FO de camarón café, fenómeno que no había sido reportado en ninguna especie. Considerando que la enzima posiblemente se encuentre en forma reducida y que la inactivación de la enzima parece estar asociada a una oxidación hacia Cu^{++} (Andrawis y Kahn, 1985), la adición de cobre podría traducirse en un aumento de dicha oxidación. Esto ayudaría a explicar la inhibición por cobre de la actividad FO del camarón.

Por otra parte, la inhibición de la FO de camarón café causada por el ADTC sugiere que es una proteína que contiene cobre (Ashida y Yamazaki, 1990). Esto es **congruente** con lo reportado por Aspán y **Söderhäll** (1991) quienes encontraron que la **proFO** de hemocitos de langostino, tiene 2 moléculas de cobre por molécula. La posterior clonación de la molécula y comparación con otras proteínas, reveló que los sitios de unión del cobre son parecidos a los de la hemocianina de crustáceos (Aspán et al., 1995).

Respecto al comportamiento cinético de la FO del camarón café se encontró una Km de 2.3 mM y una Vmáx de 1.29 $\Delta A/mg/min$. Aunque no existen muchos estudios donde reporten estos parámetros, los resultados son comparables con los encontrados en la FO de *H. virescens* donde se determinó que la enzima requiere de una concentración de 2.25 mM para llegar a la mitad de su velocidad máxima (Lockey y Ourth, 1992).

Aunque el conocimiento del sistema de defensa del camarón aún no esta completamente descubierto, hasta el momento existe un gran avance y este trabajo contribuye con la complementación del conocimiento de los mecanismos de activación del sistema **proFO** de camarón café, aportando características de la **proFO** y de la FO que deben ser consideradas en la utilización de esta molécula como herramienta de diagnóstico.

Conclusiones

El método utilizado para la obtención de la **proFO** estable fue satisfactorio, solamente hay que mantener una baja fuerza **iónica** en el medio y el calcio deberá de estar ausente. El mecanismo de acción del calcio quedó demostrado, observándose que este ión participa en la activación de la proteasa activadora de la **proFO**. Este método presenta ventajas sobre el HSL ya que se obtiene más fácil y con menos contaminantes. El almacenamiento de las muestras en congelación produjo activación espontánea de la **proFO**, por lo que se recomienda, en caso necesario, evitar el **congelamiento**. Las muestras pueden ser almacenadas a **5°C**, por un plazo no mayor de 7 días.

La enzima tanto en forma inactiva (**proFO**) como activa (FO) pudo ser aislada usando cromatografía de afinidad, haciendo posible su caracterización bioquímica, obteniéndose una masa molecular de **113.9 kDa** para la **proFO** y de **106.6 kDa** para la FO, con un pH óptimo de 8 para la reacción y un **pI** de 7.35, observándose que las dos formas de la enzima son termolábiles. La enzima FO de hemocitos de camarón café fue identificada como una fenoloxidasa tipo tirosinasa.

Así mismo, se demostró que los compuestos biológicos de origen microbiano no pueden activar la **proFO** aislada, requiriéndose la presencia de todos los componentes del sistema, mientras que el SDS, el **metanol** y la acetona pueden activar la **proFO** independientemente de la presencia de la **EAProFO**.

Perspectivas

La información **obtenida** en este trabajo permite incrementar el conocimiento sobre el sistema de defensa presente en los **invertebrados**, **especialmente** en el camarón. Este avance permitirá continuar o ser usado como base para futuros trabajos, por ejemplo:

1. Aislamiento de la enzima activadora de la **proFO**. La cual se sabe que es una proteinasa, pero se desconocen sus principales propiedades fisicoquímicas y bioquímicas.
2. Comparación de la **proFO** del camarón con otras **especies**, así como de otras partes, por ejemplo de la cutícula, la cual tiene interés para la tecnología de alimentos.
3. La detección del sitio de síntesis presenta gran interés debido a que permitiría conocer más sobre la génesis del Sistema Inmune de los invertebrados y sus correlaciones u homologías con los sistemas vertebrados. Una de las herramientas interesantes para esto es la producción de anticuerpos **anti proFO**, además de que puede probarse su uso en el diagnóstico.
4. Secuencia de aminoácidos de la **proFO**, **FO** y de la enzima activadora, así como la determinación del sitio activo y la detección del gen que codifica para la **proFO**.

Nombres científicos

| Nombre científico | Familia | Orden | Nombre común |
|---------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------|
| <i>Penaeus californiensis</i> | Penaeidae | Decápoda | camarón café |
| <i>Penaeus duorarum</i> | Penaeidae | Decápoda | camarón rosa |
| <i>Penaeus setiferus</i> | Penaeidae | Decápoda | camarón blanco |
| <i>Penaeus stylirostris</i> | Penaeidae | Decápoda | camarón azul |
| <i>Penaeus monodon</i> | Penaeidae | Decápoda | camarón tigre |
| <i>Astacus astacus</i> | Astacidae | Decápoda | langostino |
| <i>Pacifastacus leniusculus</i> | Astacidae | Decápoda | langosta |
| <i>Procambarus clarkii</i> | Astacidae | Decápoda | langosta de río |
| <i>Carcinus maenas</i> | Portunidae | Decápoda | cangrejo |
| <i>Aedes aegypti</i> | Culicinae | Díptera | mosquito |
| <i>Anopheles quadrylimatus</i> | Culicinae | Díptera | mosquito |
| <i>Anopheles gambiae</i> | Anophelinae | Díptera | mosquito |
| <i>Blaberus craniifer</i> | Blaberidae | Battaria | cucaracha |
| <i>Blaberus discoidalis</i> | Blaberidae | Battaria | cucaracha |
| <i>Bombix mori</i> | Bombycidae | Lepidóptera | gusanodeseda |
| <i>Drosophila melanogaster</i> | Drosophilinae | Díptera | mosca doméstica |
| <i>Heliothis virescens</i> | Noctunidae | Lepidóptera | gusano beyotero |
| <i>Hyalophora cecropia</i> | Saturniidae | Lepidóptera | polilla |
| <i>Locusta migratoria</i> | Cediponidae | Orthóptera | langosta migratoria |
| <i>Oryctes rhinoceros</i> | Dynastidae | Coleóptera | escarabajo |
| <i>Schistocerca gregaria</i> | Acrididae | Orthóptera | langosta del desierto |
| <i>Haloturula tubulosa</i> | Holothuroidae | Aspidochirotida | pepino de mar |

Anexo

Soluciones:

Solución anticoagulante:

| | |
|-----------------------|---------------|
| NaCl | 450 mM |
| KCl | 10 mM |
| EDTA. Na ₂ | 10 mM |
| HEPES | 10 mM |

pH 7.3

Osmolalidad 850 mOsm/kg

Se preparó con material y agua libre de pirógenos. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en refrigeración (Vargas-Albores et al., 1993b).

Enzimas

| | |
|----------|--------|
| Tripsina | 0.1mg |
| Agua | 1.0 mL |

Sustrato

| | |
|--------|--------|
| L-DOPA | 3mg |
| agua | 1.0 mL |

Reactivo de Bradford

| | |
|-------------------------|--------|
| Azul de Coomassie G | 70 mg |
| Etanol al 95 % | 50 mL |
| Acido fosfórico al 85%, | 100 mL |

El colorante se disolvió en el etanol agitando durante 4 horas, posteriormente se agregó el ácido fosfórico, se aforó a un litro con agua destilada y se filtró (Bradford, 1976).

Amortiguador de Cacodilatos, según Leonard (1985b):

Cacodilato de sodio **10 mM**
pH 7.0

Amortiguador TRIS-Glicina-SDS:

Tris **25 mM**
Glicina **192 mM**
SDS **1%**
pH 8.3

Amortiguador para dilución de muestras TRIS-SDS pH 6.8:

| | |
|------------------------------------|--------|
| Agua destilada | 4.4 mL |
| Glicerol | 0.8 mL |
| Azul de bromofenol 0.05% | 0.2 mL |
| SDS 10% | 1.6 mL |
| Amortiguador TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8 | 1.0 mL |

Amortiguador para dilución de muestras TRIS pH 6.8:

| | |
|------------------------------------|--------|
| Agua destilada | 6.0 mL |
| Glicerol | 0.8 mL |
| Azul de bromofenol 0.05% | 0.2 mL |
| Amortiguador TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8 | 1.0 mL |

Amortiguador TRIS-Glicina:

| | | |
|---------|----|--------|
| Tris | .. | 25 mM |
| Glicina | | 192 mM |

pH 8.3

Solución de desteñido o fijadora:

| | |
|----------------|-----|
| Metanol | 50% |
| Acido acético | 10% |
| Agua destilada | 40% |

Colorante azul de Coomassie

| | |
|----------------------------|------|
| Azul de Coomassie R | 0.1% |
|----------------------------|------|

Se diluyó en solución de desteñido, se almacenó a temperatura ambiente y antes de cada uso se filtró.

Referencias

- Andersen, S.O., **Jacobsen, J.P., Bojesen, G. & Roepstorff, P.** (1992) Phenoloxidase catalyzed coupling of catechols - Identification of novel coupling products. *Biochem. Biophys. Acta.* 1118: 134-138.
- Andersson, K., Sun, S.C., **Boman, H.G. & Steiner, H.** (1989) Purification of the prophenoloxidase from *Hyalophora cecropia* and four proteins involved in its activation. *Insect Biochem.* 19: 629-637.
- Andrawis, A. & Kahn, V. (1985) Inactivation of mushroom tyrosinase by hydrogen peroxide. *Phytochemistry.* 3: 397-405.
- Armstrong, **P.B., Mangel, W.F., Wall, J.S., Hainfield, J.F., Vanholde, K.E., Ikai, A. & Qu, X.M.** (1991) Structure of $\alpha 2$ macroglobulin from the arthropod *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.* 266: 2526-2530.
- Ashida, M. (1981) A **cane** sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 11: 57-65.
- Ashida, M. (1990) The prophenoloxidase **cascade** in insect immunity. *Res. Immunol.* 141: 908-910.
- Ashida, M., Ishizaki, Y. & Iwahana, H. (1983) Activation of pro-phenoloxidase by bacteria1 **cell walls or α -1,3-glucans** in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 562-568.
- Ashida, M., Ochiai, M. & Niki, T. (1988) Immunolocalization of prophenoloxidase among hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue Cell.* 20: 599-610.
- Ashida, M. & **Söderhäll, K.** (1984) The prophenoloxidase activating system in **crayfish**. *Comp. Biochem. Physiol.* 778: 21-26.
- Ashida, M. & Yamazaki, H. (1990) Biochemistry of the phenoloxidase system in **insects**; with **special reference** to its activation., in: Ohnishi, E. & Ishizaki, H. (Eds.) *Molting and Metamorphosis.*, pp. 239-265 (Berlin, Springer-Verlag).
- Ashida, M. & Yoshida, H. (1988) Limited proteolysis of prophenoloxidase during activation by microbial products in insect plasma and effect of phenoloxidase on electrophoretic mobilities of plasma proteins. *Insect Biochem.* 18: 1-20.
- Aspán, A., Huang, T., Cerenius, L. & Söderhäll, K.** (1995) **cDNA** cloning of prophenoloxidase from the freshwater **crayfish** *Pacifastacus leniusculus* and its activation. *Biochem.* 92: 939-943.
- Aspán, A. & Söderhäll, K.** (1991) Purification of prophenoloxidase from **crayfish** blood cells, and its activation by an endogenous **serine** proteinase. *Insect Biochem.* 21: 363-373.
- Aspán, A., Sturtevant, J., Smith, V.J. & Söderhäll, K.** (1990) Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from **crayfish** blood cells. *Insect Biochem.* 20: 709-718.
- Bach, J. (1984) Inmunología. LIMUSA, E., Mexico, D.F.
- Barracco, M.A., Duvic, B. & Söderhäll, K.** (1991) The **β -1,3-glucan-binding** protein from the **crayfish** *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a **β -1,3-glucan**, induces spreading and degranulation of **crayfish** granular cells. *Cell Tissue Res.* 266: 491-497.

- Barrett, F.M. (1987) Phenoloxidases from larval **cuticle** of the sheep **blowfly, *Lucilia cuprina***: **Characterization**, developmental **changes**, and inhibition by antiphenoloxidase antibodies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5: 99-118.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing principle of protein dry binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brehélin, M., Boigegrain, R.A., Drif, L. & Coletti-Previero, M.A. (1991) Purification of a protease inhibitor which **controls** prophenoloxidase activation in hemolymph of *Locusta migratoria* (Insecta). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 841-846.
- Brehélin, M., Drif, L., Baud, L. & Boemare, N. (1989) Insect haemolymph: Cooperation between humoral and **cellular factors** in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19: 301-307.
- Brivio, M.F., Pagani, M. & Scarj, G. (1992) Biochemical **evidence** of phenoloxidase activity (pro-PO system) in larvae of *Allogamus auricollis* (Insecta, Trichoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 1028: 867-871.
- Brookman, J.L., Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (1969) Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacteria cell wall components. *Insect Biochem.* 19: 47-57.
- Chen, J.S., Preston, J.F., Wei, C., Hooshar, P., Gleeson, R.A. & Marshall, M.R. (1992) Structural comparison of crustacean, potato, and mushroom polyphenol oxidases. *J. Agr. Food Chem.* 40: 1326-1330.
- Collins, F.H. & Besansky, N.J. (1994) Vector biology and the control of malaria in Africa. *Science.* 264: 1874-1875.
- Collins, F.H., Sakai, R.K., Vemick, K.D., Paskewitz, S., Seeley, D.C., Miller, L.H., Collins, W.E., Campbell, C.C. & Gwatz, R.W. (1986) Genetic selection of a Plasmodium-refractor strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science.* 234: 607-610.
- Dixon, M., Webb, E., Thome, C. & Tipton, K. (1979) *Enzymes*. Press, E. A., New York.
- Dularay, B. & Lackie, A.M. (1985) Haemocytic encapsulation and the prophenoloxidase-activation pathway in the locust *Schistocerca gregaria* forks. *Insect Biochem.* 15: 827-834.
- Dunn, P.E. (1986) Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 321-329.
- Durrant, H.J., Ratcliffe, N.A., Hipkin, C.R., Aspán, A. & Söderhäll, K. (1993) Purification of the pro-phenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*. *Biochem. J.* 289: 87-91.
- Duvic, B. & Söderhäll, K. (1990) Purification and characterization of a b-1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 265: 9337-9332.
- Duvic, B. & Söderhäll, K. (1992) Purification and partial characterization of a b-1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 207: 223-228.
- Duvic, B. & Söderhäll, K. (1993) b-1,3-glucan-binding proteins from plasma of the fresh-water crayfishes *Asfacus asfacus* and *Procambarus clarkii*. *J. Crust. Biol.* 13: 403-408.
- Ford, S.E., Kanaley, S.A. & Littlewood, D.T.J. (1993) Cellular responses of oysters infected with *Haplosporium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 49-57.

- Gollas-Galván, T., Hernández-López, J. & Vargas-Albores, F. (1996)** Effect of **calcium** on the brown **shrimp** (*Penaeus californiensis*) prophenoloxidase system activation. *Comp. Biochem. Physiol.* En prensa.
- Guzmán-Murillo, A., Ochoa, J.L.S. & Vargas-Albores, F. (1993)** The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* **106A: 271-275.**
- Hara, T., Miyoshi, T. & Tsukamoto, T. (1993)** Comparative **studies on** larval and **pupal** phenoloxidase of the housefly, *Musca domestica* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **106B: 287-292.**
- Hergenahn, H.G., Häll, M. & Söderhäll, K. (1988)** **Purification** and characterization of an α_2 -macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Biochem. J.* **255: 801-806.**
- Hernández-López, J. (1996)** Activación del sistema fenoloxidasa de hemocitos de camarón café (*Penaeus californiensis*) y su efecto en la fagocitosis. **Tesis de maestría.** Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. .
- Hernández-López, J., Gollas, G.T. & Vargas, A.F. (1996)** Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* **113c: 61-66.**
- Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1985)** Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.* **156B: 175-181.**
- Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1988)** Isolation and **purification** of a **cell** adhesion factor from crayfish blood **cells**. *J. Cell Biol.* **106: 1795-1803.**
- Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1989a)** A **cell** adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular **cells**. *Insect Biochem.* **19: 183-190.**
- Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1989b)** **Cellular** immunity in crustaceans and the **proPO** system. *Parasitol. Today.* **5: 171-176.**
- Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1992)** **Cellular** defence and **cell** adhesion in crustacean. *Anim. Biol.* **1: 97-107.**
- Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1993)** **Intracellular** signaling in **arthropod** blood **cells**: involvement of protein kinase C and protein tyrosine **phosphorylation** in the response to the **76-kDa** protein or the β -1,3-**glucan-binding** protein in crayfish. *Develop. Comp. Immunol.* **17: 495-500.**
- Kobayashi, M., Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1990)** The 76 **kD cell-adhesion** factor from crayfish haemocytes **promotes** encapsulation *in vitro*. *Cell Tissue Res.* **260: 13-18.**
- Kopáček, P., Grubhoffer, L. & Söderhäll, K. (1993)** Isolation and characterization of a hemagglutinin with **affinity** for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Develop. Comp. Immunol.* **17: 407-418.**
- Lackie, A.M. (1980)** Invertebrate immunity. *Parasitology.* **80: 393-412.**
- Lackie, A.M. (1988)** Immune mechanisms in **insects**. *Parasitol. Today.* **4: 98-105.**
- Lanz, H., Hernández, S., Garrido-Guerrero, E., Tsutsumi, V. & Aréchiga, H. (1993)** Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Develop. Comp. Immunol.* **17: 399-406.**

- Leonard, C., Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (1985a) The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *J. Insect Physiol.* 31: 789-799.
- Leonard, C., Söderhäll, K. & Ratcliffe, N.A. (1985b) Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* 15: 803-810.
- Lerch, K. (1988) Protein and active site structure of tyrosinase. *Advances in Pigment Cell Reserch.* Bagnara, E. b., U.S.A. 85-98.
- Liang, Z., Lindblad, P., Beauvais, A., Johansson, MW., Latge, J.-P., Hall, M., Cereneus, L. & Söderhäll, K. (1992) Crayfish a-macroglobulin and 78 kDa protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76 kDa protein. *J. Insect Physiol.* 38: 987-995.
- Lightner, D.V. (1983) Diseases of cultured penaeid shrimp. *Crustacean aquaculture, Vol I.* McVey, J. P. & Moore, J. R., Florida, USA. 289-320.
- Lockey, T.D. & Ourth, D.D. (1992) Isolation and characterization of hemolymph phenoloxidase from *Hekthis virescens* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 1028: 891-896.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.L., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Marshall, T. (1984) Detection of protein in polyacrylamide gels using an improved silver stain. *Anal Biochem.* 136: 340-346.
- Nappi, A.J., Carton, Y. & Frey, F. (1991) Parasite-induced enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 18: 159-168.
- Nappi, A.J., Carton, Y., Li, J. & Vass, E. (1992) Reduced cellular immune competence of a temperature-sensitive DOPA decarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina boulardi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 101 B: 453-460.
- Nappi, A.J. & Seymour, J. (1991) Hemolymph phenol oxidases in *Drosophila melanogaster*, *Locusta migratoria*, and *Austropotamobius pallipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 748-754.
- Nayar, J.K. & Bradley, T.J. (1994) Comparative study of hemolymph phenoloxidase activity in *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* and its role in encapsulation of *Brugia malayi* microfilariae. *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 929-938.
- Ochiai, M., Niki, T. & Ashida, M. (1992) Immunocytochemical localization of b-1,3-glucan recognition protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res.* 268: 431-437.
- Opoku-Gyamfua, A., Simpson, B.K. & Squires, E.J. (1992) Comparative studies on the polyphenol oxidase fraction from lobster and tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.* 5: 772-775.
- Pawelek, J.M. (1991) After dopachrome? *Pigment Cell Research.* 4: 53-62.
- Preston, W. & Taylor, R. (1970) Observations on the phenoloxidase system in the haemolymph of the cockroach *Leucophaea maderae*. *J. insects. Physiol.* 16: 1729-1744.
- Ratanapo, S. & Chulavatnatol, M. (1990) Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 97 B: 515-520.
- Ratanapo, S. & Chulavatnatol, M. (1992) Monodin-induced agglutination of *Vibrio vulnificus*, a major infective bacterium in black tiger prawn (*Penaeus monodon*). *Comp. Biochem. Physiol.* 1028: 855-859.

- Ratcliffe, N.A. (1985) Invertebrate immunity - a **primer** for the non-specialist. *Immunol. Lett.* 10: 253-270.
- Ratcliffe, N.A., **Brookman**, J.L. & Rowley, A.F. (1991) Activation of the prophenoloxidase **cascade** and initiation of nodule formation **in** locusts by bacteria¹ lipopolysaccharides. *Develop. Comp. Immunol.* 15: 33-39.
- Ratcliffe, N.A. & Gotz, P. (1990) **Functional** studies **on** insect haemocytes, including non-self recognition. *Res. Immunol.* 141: 919-923.
- Ratcliffe, N.A., Leonard, C. & Rowley, A.F. (1984) Prophenoloxidase activation: Nonself recognition and **cell** cooperation **in** insect immunity. *Science.* 226: 557-559.
- Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. (1979) A **comparative** synopsis of the structure and function of the blood **cells** of **insects** and other **invertebrates**. *Develop. Comp. Immunol.* 3: 189-243.
- Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. & Rhodes, C.P. (1985) Invertebrate immunity: **Basic concepts** and **recent advances**. *Int. Rev. Cytol.* 97: 183-350.
- Ratner, S. & Vinson, S.B. (1983) Phagocytosis and Encapsulation: **Cellular** Immune Responses **in** Arthropoda. *Am. Zool.* 23: 185-194.
- Renwranz, L. (1986) Lectins **in molluscs** and arthropods: their occurrence, **origin** and roles **in** immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 56: 81-93.
- Rizki, R.M. & Rizki, T.M. (1990) Encapsulation of parasitoid eggs **in phenoloxidase-deficient** mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 36: 523-529.
- Roch**, P., Canicatti, C. & Sammaroco, S. (1992) **Tetrameric** structure of the active phenoloxidase evidenced **in** coelomocytes of the echinoderm *Holotorula tubulosa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1028: 349-355.
- Rowley, A.F. & Rahmet-Alia, M. (1990) Prophenoloxidase activation **in** the blood of *Leucophaea maderae* by microbial **product** and different strains of *Bacillus cereus*. *J. Insect Physiol.* 36: 931-937.
- Saul**, S.J. & Sugumaran, M. (1986) Protease inhibitor **controls** pro-phenoloxidase activation **in** *Manduca sexta*. *FEBS Lett.* 208: 11-16.
- Saul**, S.J. & Sugumaran, M. (1987) Protease mediated prophenoloxidase activation **in** the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5: 1-11.
- Saul**, S.J. & Sugumaran, M. (1988) Prophenoloxidase activation **in** the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 7: 91-103.
- Simpson, B.K., **Marshall**, M.R. & Otwell, W.S. (1988) Phenoloxidases from pink and white **shrimp**: Kinetic and other properties. *J. Food Biochem.* 12: 205-217.
- Simpson, B.K., **Marshall**, M.R. & Otwell, W.S. (1987) Phenoloxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): **Purification** and **some** properties. *J. Agric. Food Chem.* 35: 918-921.
- Smith, V.J. & **Söderhäll**, K. (1986) **Cellular** immune mechanism **in** the crustacea. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 56: 59-79.
- Söderhäll**, K. (1981) Fungal cell wall **1,3-glucans** induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surface of **crayfish** hemocyte lysate. *Develop. Comp. Immunol.* 5: 563-573.

- Söderhäll, K. (1982) Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review. *Develop. Comp. Immunol.* 8: **601-611**.
- Söderhäll, K. (1985) The **bee** venom melittin induces **lysis** of arthropod granular **cells** and inhibits activation of the prophenoloxidase-activating **system**, *FEBS Lett.* 192: 109-112.
- Söderhäll, K. (1992) Biochemical and molecular **aspects** of cellular communication **in** arthropods. *Boll. Zool.* 59: 141-151.
- Söderhäll, K. & Ajaxon, R. (1982) Effect of quinones and melanin **on** mycelial growth of *Aphanomyces* spp and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite **on** crayfish. *J. Invertebr. Path.* 39: **105-109**.
- Söderhäll, K., Aspán, A. & Duvic, B.** (1990) The **proPO** system and associated proteins -Role in cellular communication **in** arthropods. *Res. Immunol.* 141: **896-907**.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. & Johansson, M.W. (1994) The prophenoloxidase activating system and its role **in** invertebrate defense. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712: 155-181.
- Söderhäll, K. & Hall, L. (1984) Lipopolysaccharide-induced **activation** of prophenoloxidase activating system **in** crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta.* 797: 99-104.
- Söderhäll, K., Ragener, W., Söderhäll, I., Newton, R.P. & Ratcliffe, N.A. (1988) The properties and **purification** of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a b-1, **3-glucan**. *Insect Biochem.* 18: 323-330.
- Söderhäll, K. & Smith, V.J. (1983) Separation of the **haemocyte** populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. *Develop. Comp. Immunol.* 7: 229-239.
- Söderhäll, K., Smith, V.J. & Johansson, M.W. (1988) Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: **evidence** for cellular co-operation **in** the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.* 245: 43-49.
- Söderhäll, K. & Unestam, T. (1979) Activation of serum prophenoloxidase **in** arthropod immunity. The **specificity** of cell wall glucan activation and activation by **purified** fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. *Can. J. Microbiol.* 25: **406-414**.
- Söderhäll, K., Vey, A. & Ramstedt, M. (1984) Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.* 8: 23-29.
- Stöcker, W., Breit, S., Sottrup-Jensen, L. & Zwilling, R. (1991) Alfa 2-macroglobulin from the haemolymph of the freshwater crayfish *Astacus astacus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 501-509.
- Sugumaran, M. & Nellaiappan, K. (1991) Prophenoloxidase activation by **lipids**. *Am. Zoo.* 31: 88A.
- Thangaraj, T., Santhakumari, R. & Logankumar, K. (1990) Haemocyte phenoloxidase **in** the larval forms of the coconut pest *Oryctes rhinoceros*. *J. Ecobiol.* 2: 33-44.
- Thörnqvist, P.O., Johansson, M.W. & Söderhäll, K. (1994) Opsonic activity of **cell** adhesion proteins and b-1, **3-glucan** binding proteins from two crustaceans. *Develop. Comp. Immunol.* 18: 3-12.
- Tsukamoto, T., Maruta, K., Inaba, T., Yamasaki, N., Aso, Y., Yamaura, I. & Funatsu, M. (1988) Kinetic properties of phenoloxidase isolated from the **larvae** of housefly. *Biochem. Int.* 16: 785-790.

- Unestam, T. & **Söderhäll**, K. (1977) Soluble fragments from fungal **cell wall** elicit defence reactions **in crayfish**. *Nature*. 267: 45-46.
- Vargas-Albores, **F.** (1992) Sistemas de defensa del camarón **café** (*Penaeus californiensis*). Ph. D. Thesis, Universidad Nacional Autónoma De **México**.
- Vargas-Albores, F. (1995) The defense system of the shrimp (*Penaeus californiensis*): humoral recognition and **cellular** responses. *J. Marine Biotechnol.* 3: 1 **55-156**.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, A. & Ochoa, J.L. (1991) Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en la acuicultura. *Biotecnología*. 1: 17-25.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, A. & Ochoa, J.L. (1993a) A Lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown **shrimp** (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* **104A**: 407-413.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M.A. & Ochoa, J.L. (1992) Sizedependent haemagglutinating activity **in the haemolymph** from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.* 103A: 487-491.
- Vargas-Albores, F., **Guzmán-Murillo**, M.A. & Ochoa, J.L. (1993b) **An anticoagulant** solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303.
- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F. & **Söderhäll**, K. (1996) A plasma protein isolated from ahirimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by b-1,3 glucan. *Develop. Comp. Immunol.* 8: **515-522**.
- Vasta, G.R. & Cohen, E. (1984) Sialic **acid binding lectins in** the serum of **american** spiders from the genus Aphonopelma. *Develop. Comp. Immunol.* 8: 51 S-522.
- Vasta, G.R. & Marchalonis, J.J. (1983) Humoral recognition **factors in** the Arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins. *Am. Zool.* 23: 157-171.
- Yamaura, I., Yonejura, M., Katsura, Y., Ishiguro, M. & Funatsu, M. (1980) **Purification and some** physicochemical properties of phenoloxidase from the **larvae** of housefly. *Agric. Biol. Chem.*
- Yoshida, H. & Ashida, M. (1986) Microbial activation of two **serine** enzymes and prophenoloxidase **in the plasma fraction** of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 16: 539-545.

Producción científica generada de este
trabajo



Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes)

Jorge Hernández-López, Teresa Gollas-Galván and Francisco Vargas-Abres
CENTER FOR BIOLOGICAL RESEARCH, PO BOX 128, LA PAZ, B.C.S., 23000, MÉXICO

ABSTRACT. The prophenoloxidase (proPO) system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*) was activated using different preparations and inducers. In shrimp, this system is confined inside the hemocytes and can be obtained by lysing or centrifuging the cells. In both cases, the shrimp proPO system showed a high spontaneous activation because the proPO activating enzyme was also released. In addition, the shrimp proPO system could be activated by laminarin, but not by bacterial LPS. Although SDS and other chemicals are also capable of activating shrimp proPO, this activation proceeds in different ways since it can not be inhibited by proteinase inhibitors. **COMP BIOCHEM PHYSIOL 113C, 61-66, 1996**

KEY WORDS: *Penaeus californiensis*, prophenoloxidase system, shrimp immunology, crustacean defense system, brown shrimp

INTRODUCTION

The prophenoloxidase (proPO) system is considered a constituent of the immune system and is probably responsible, at least in part, for the nonself recognition process of the defense mechanism in crustaceans and insects (15, 17, 12, 26). The major enzyme produced during proPO system activation is phenoloxidase (PO, o-diphenol-oxygen oxidoreductase; E.C. 1.10.3.1) which is necessary for the melanization process observed in response to foreign matter invading the hemocoel and during wound healing (for review see 11, 4, 25, 26).

The proPO system can be specifically activated using β -1,3-glucans (22, 2), bacteria cell walls (2, 18), and lipopolysaccharide (LPS) (27). Although activation of the proPO system by bacterial LPS has been demonstrated in several arthropod models (7, 27), in other cases, attempts to show activation by LPS have been unsuccessful (4, 23, 16). Nevertheless, proPO system activation by bacteria has been shown in all cases (4, 8, 2). Thus, it has been proposed that in arthropods, the proPO system present in the hemolymph may constitute a recognition system (15, 17, 11, 26). Furthermore, the proPO system has been proposed as the invertebrate counterpart of the vertebrate complement system since it is activated by β -1,3-glucans (12, 1, 22, 32), has a cascade reaction, and involves proteases (6, 25, 26). However, other than these similarities, a direct lytic activity has not been detected in the proPO system.

The brown shrimp (*Penaeus californiensis*) is commercially important as a cultured species in Mexico, but like other shrimp species, it is susceptible to infectious diseases. Two serum proteins have been described as a part of its defense system: an agglutinin that reacts with LPS and bacteria (33), and a hemolytic factor (9). Previously, we detected the proPO system in the brown shrimp hemocytes (32), but studies on its activation were not done. Furthermore, at times we observed proPO activity in cell-free shrimp plasma. In all arthropod species studied to date, proPO system is present in the hemolymph as an inactive proenzyme called prophenoloxidase, located in the hemocyte of many insects (15, 17, 12, 8, 18) and crustaceans (11, 28). This system has been also detected in the plasma of some insects (1, 19, 21, 7), but in crustaceans it is apparently confined within the hemocytes. In this study, we determined the origin of the proPO detected in shrimp plasma, tested another method for proPO system isolation, and stimulated it by different chemical and microbial elicitors in order to explain its role in the shrimp defense system.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals were purchased from Sigma Chem. Co. The glassware was washed with Toxa-Clean (Sigma Chem. Co.) to avoid any spontaneous activation of the proPO system by endotoxins. For the same reason, all solutions were prepared using pyrogen-free water.

Solutions

The shrimp anticoagulant solution was prepared by adding of 10 mM EDTA.Na₂ to shrimp salt solution (SSS), which corresponds to the ionic and osmotic values of shrimp hemo-

Address reprint requests to: Dr. Francisco Vargas-Abres, Center for Biological Research, PO Box 128, La Paz, BCS, 23000 México.

Received 15 June 1995; revised 12 September 1995; accepted 15 September 1995.

lymph (32): 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3. 850 mOsm/Kg. A cacodylate buffer (Cac: 10 mM sodium cacodylate, 10 mM CaCl₂, pH 7.0) was used to obtain of proPO system and to determine phenoloxidase (PO) activity.

Animals

The shrimps, *Penaeus californiensis*, were grown in an experimental tide pond (Center for Biological Research, La Paz, BCS, Mexico). The animals were maintained in an aquarium (24 ± 4°C, salinity: 36 parts per thousand) at least 2 days before the experiment. Only the hemolymph from intermolt, apparently healthy shrimp was used.

Extraction and Separation of the Hemolymph

The hemolymph was extracted from the pleopod base of the first abdominal segment near the genital pore. One hundred µl of hemolymph were obtained using a 0.5 ml syringe, 27 gauge needle, containing 200 µl of precooled (10°C) anticoagulant solution. The hemolymph was then centrifuged at 560 g for 3 min and the supernatant was separated.

Protein Content Determination

The total protein content was measured according to Lowry *et al.* (14) using bovine serum albumin as standard.

Enzymatic Activity

The phenoloxidase activity was measured spectrophotometrically (in triplicate) by recording the formation of dopachrome from L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) according to Leonard *et al.*, (13). Briefly, the sample (100 µl) was pre-incubated with 50 µl of laminarin (1 mg/ml in Cac buffer) or, in the case of controls with Cac buffer, for 1 hr at 25°C before 50 µl of L-DOPA (3 mg/ml of Cac buffer) were added. The reaction was allowed to proceed for 10 min at 20°C, then 800 µl of Cac buffer were added and the absorbance at 490 nm was measured. Enzyme activity was expressed as the change in absorbance at 490 nm per min per mg of protein. We modified this process for smaller samples. Fifty microliters of sample were placed in a microwell plate and preincubated with 50 µl of laminarin (1 mg/ml in Cac buffer) for 30 min at 25°C before 50 µl of L-DOPA (3 mg/ml in Cac buffer) were added. After 10 min of incubation at 25°C, the optical density was recorded using a ELISA reader (Labsystems Uniskan II) at 492 nm. Total amount of proPO available was determined after sample incubation with 50 µl of trypsin (100 µg/ml in Cac buffer) allowing the proPO activation reaction to proceed for 10 min at 25°C. The amount of inactive proPO in sample containing also PO activity was calculated as total available proPO minus PO activity before trypsin treatment.

Crude proPO System Preparations

Two different methods were used to obtain proPO samples from shrimp hemocytes: lysing the hemocytes and induced degranulation by centrifugation. For hemocyte lysate, the hemolymph from 10 shrimps was collected in anticoagulant solution as described above and centrifuged at 700 g for 5 min. The cell pellets were pooled and resuspended in Cac buffer, then disrupted by sonication for 2 min at 20 W. The hemocyte lysate was centrifuged at 70,000 g for 30 min at 4°C, and the cell debris was discarded. Phenoloxidase activity and available proPO, as well as protein content were determined in the supernatant (Hemocyte lysate supernatant: HLS).

Samples for proPO system were also obtained by inducing degranulation. In this case, the hemolymph (200 µl) was centrifuged at 700 g, the cell pellet was resuspended in 200 µl of Cac buffer, then centrifuged at 15,900 g for 20 sec. The supernatant containing the granular content was removed and used as proPO source. Granular cells were not lysed during centrifugation process, as corroborated by light microscopy.

Chemical Activation

Absolute ethanol, SDS (1% w/v) and urea (2 M) were tested as activators of shrimp proPO. The samples were obtained in Cac buffer and incubated with equal volume of the chemical for 30 min at room temperature before determining both PO activity and total available proPO. Soybean trypsin inhibitor (STI) was tested as an inhibitor of the proPO system activation elicited by trypsin and SDS. In these experiments, 25 µl of STI was added (200 µg/ml) together with 25 µl of trypsin (100 µg/ml).

Inhibition by Melittin

The samples were obtained in Cac with (50 µg/ml) or without melittin and incubated for 30 min at room temperature before determining both PO activity and total proPO. In other experiments, the samples were kept for 24 or 48 hr at 8°C and analyzed. The effect of melittin (final concentration 50 µg/ml) on the stability of the proPO system was assayed at 0 and 5°C for 7 days, by incubating different aliquots and analyzing one per day.

RESULTS AND DISCUSSION

To provide an adequate methodology for phenoloxidase activity in small volumes, we tested a modification of the method described by Leonard *et al.* (13) using 96-well microplates. Because an adequate precision (CV < 10%) and correlation ($r = 0.99$) between tube and microplate techniques were obtained, all determinations during the activation were done in microplates. The tube method was used only for specific activity calculation.

Previously, we reported (32) that in the brown shrimp the

proPO system is located inside the hemocytes, similar to other crustaceans (11,25,26) and some insects (12,13,8,18). However, under some experimental conditions, proPO was found in shrimp plasma. Although the proPO has been detected in both the hemocytes and plasma of insects (1,19,21,7), until now there has been no evidence of a proPO system present in crustacean plasma. Apparently, the proPO system is confined inside the hemocytes.

Ashida (1) claimed that in the silkworm, *Bombyx mori*, the proPO system is contained in the plasma. To obtain a stable proPO system, they injected a cane sugar factor to insect larvae before bleeding. However, the total hemocyte count dropped from ca 1×10^4 cells to ca 1×10^3 cells/mm³ of hemolymph (1). Thus it is probable that most of the cells (90%) were activated and disappeared from circulation, either by lysis or differential sticking. Since crustacean hemocytes are extremely sensitive to low doses of β -1,3-glucans (22) or LPS (10), it is likely that the cane sugar factor caused extensive degranulation of the hemocytes, resulting in the release of the proPO system and its detection in the plasma. However, to obtain the shrimp proPO, only salts were used for hemolymph extraction, and all preventive measures to avoid cellular and proPO system activation were taken (pyrogen-free water, plastic and glassware endotoxin-free or cell culture tested quality, etc.).

We investigated the effect of needle size on the release of proPO system testing four different gauges (25, 22, 21 and 20) during hemolymph extraction. Only the chickesc needle (gauge 20) showed a statistically significant increase in the plasma proPO values, perhaps due to tissue damage (30). Since no differences were observed with the small needles that are routinely used for shrimp hemolymph extraction, we evaluated the effect of centrifugation. When the hemolymph was centrifuged in a microfuge (Beckman Model E) at 15,900 g and the cells spun down for 15-20 sec, the proPO activity was detected in the plasma. Using other forces (800-400 g), a significant reduction in the plasma proPO was found (from 0.240 to 0.030 unics of optical density at 490 nm). Thus the proPO activity detected in plasma is apparently released from the hemocytes during centrifugation. Lower centrifugation forces do not permit cell pelleting and could not be evaluated. For practical reasons, the hemocyte integrity was not apparently affected when the hemocytes released a small amount of proPO by centrifugation at 800 g. Furthermore, PO activity was not detected, indicating that centrifugation releases only the inactive proPO system. Routinely, 600-800 g can be used to separate and rinse shrimp hemocytes without apparent cellular damage and/or activation.

Most of the studies on crustacean proPO activation use the supernatant from hemocyte lysis (HLS) as an enzyme source (22,27,13,8). Using a similar methodology, we detected the presence of proPO in the supernatant of a hemocyte lysate from the brown shrimp. However, the HLS was unstable and showed spontaneous activation determined as PO activity.

According to some authors (27,3,13), calcium is very important for proPO stability, and they recommend using high concentrations of this cation (40-200 mM) to avoid its spontaneous activation. Looking for a stable preparation, we tested different calcium concentrations (from 5 to 200 mM) in Cac buffer, but spontaneous activation was not avoided completely. When other buffers were used for HLS preparation, we obtained changes in the PO:proPO ratio. As shown in Table 1, by replacing 100 mM Ca for 450 mM NaCl, the spontaneous activation (measured as PO) was reduced from 23% to 8% of the total available proPO. A similar low value of active PO was obtained by using SSS + 100 mM Ca instead of Cac buffer + 100 mM Ca. Thus, spontaneous activation of the shrimp proPO system can not be avoided by high calcium concentration only, but by also increasing the medium salinity. Considering that SSS and shrimp hemolymph have similar salinity (34), this property can naturally have a positive effect and prevent the extensive spontaneous activation of the proPO system.

Knowing that centrifugation force causes hemocyte degranulation without cellular lysis, we improved the proPO extraction by centrifuging the cells at 15,900 g in Cac buffer. Although the cells still retained part of the proPO system, a good preparation of proPO system can be obtained with low contamination of other non-related proteins. In addition, a less spontaneous activation was detected in the centrifugate (20%) compared to HLS where 50% or more of the total available proPO was transformed to PO.

The effect of salinity on hemocyte degranulation was also evaluated. At NaCl concentrations near the salinity (450 mM NaCl) of the shrimp hemolymph (34), the release of proPO is minor (Fig. 1). Accordingly, the salinity and, consequently, the osmolality of the media, has an important effect in the release of the proPO system. When the cell centrifugation was done in Cac buffer without NaCl, 8-10 times of proPO were released compared to Cac buffer plus 450 mM NaCl. Since this phenomenon was observed at both 600 and 15900 g, the salinity more than the centrifugation force had the most effect on proPO system release. However, the proPO system obtained by centrifugation in Cac buffer with or without NaCl was also unstable, and spontaneous activation of the proPO system was observed. After 6 hr at room temperature, samples obtained in Cac buffer without NaCl, only showed

TABLE 1. Effect of calcium and NaCl on the stability of the activating proPO system from shrimp HLS. Percentages (Mean values \pm standard deviation) of PO and proPO are relative to total available proPO are given.

| Buffer Composition | % PO | % proPO |
|--|----------------|----------------|
| Cac buffer + 100 mM CaCl ₂ , pH 7.0 | 24.9 \pm 5.9 | 75.1 \pm 5.9 |
| Cac buffer + 450 mM NaCl, pH 7.0 | 8.9 \pm 4.1 | 91.1 \pm 4.1 |
| SSS + 100 mM CaCl ₂ , pH 7.3 | 2.2 \pm 2.6 | 97.5 \pm 7.7 |

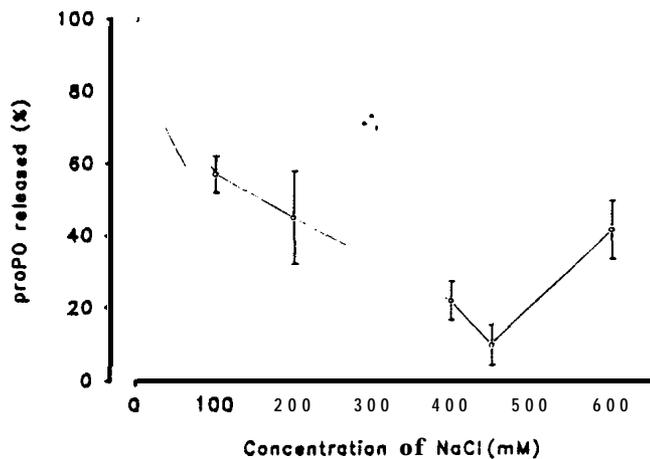


FIG. 1. Influence of the salinity on the release of proPO from shrimp hemocytes. The cells were resuspended in Cac buffer + NaCl, centrifuged, and total available proPO was determined in the supernatant.

phenoloxidase activity, but not residual available proPO. Addition of Ca did not increase the proPO system stability.

Melittin has been reported to be an inhibitor of the proPO system (24). By including 50 $\mu\text{g/ml}$ in the buffer, it was possible to reduce the spontaneous activation of the brown shrimp proPO system. When the samples were obtained without melittin, 20–30% of the total proPO was transformed to PO while in samples containing the inhibitor, the spontaneous activity was reduced to 1–2% (time zero in Fig. 2). The role of melittin on the stability of the proPO crude preparation was also monitored for 48 hr at 8°C, determining both PO activity and proPO (Fig. 2). The samples without melittin showed an initial spontaneous activation near 30%; and after 48 hr, all available proPO was transformed into active PO. Meanwhile, the samples containing melittin were more stable, and only a little (1.7 ± 0.2) PO activity was detected at time zero. After 48 hr at 8°C, approximately 80% of the total available proPO

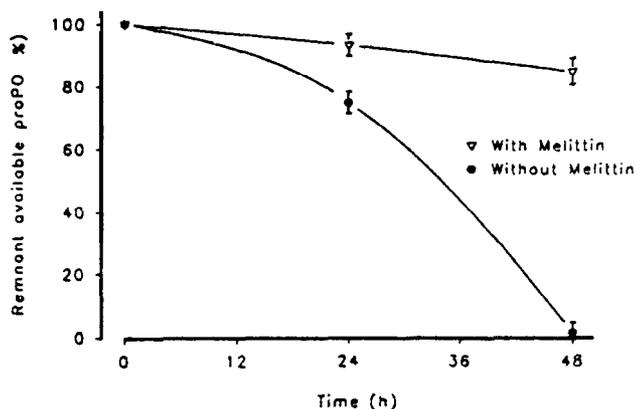


FIG. 2. Effect of melittin (50 $\mu\text{g/ml}$) on the spontaneous activation of the shrimp proPO at 8°C. The percentage of remnant available proPO was calculated by subtracting PO activity to total available proPO.

was recovered. In other series of experiments, the effect of melittin (50 $\mu\text{g/ml}$) on the stability of the proPO preparation was monitored at 0 and 5°C for 7 days, by incubating different aliquots and analyzing one per day. After 7 days at 0°C, around 50% of the proPO was transformed into PO (Fig. 3). Meanwhile, the samples incubated at 5°C were stable for 7 days, and spontaneous activation was not observed.

The proPO system has been implicated in the defense mechanism as a way to recognize invading microorganisms. So, it is desirable that it responds to nonself triggers, mainly those related with microorganisms such as β 1-3 glucans or LPS. However, as expected, laminarin or LPS induced activation was not observed using melittin treated samples of shrimp proPO system. Thus, to test it, we must consider spontaneous activation and work in the absence of inhibitors. The following experiments were undertaken to evaluate activation of the shrimp proPO system by microbial products, and were performed with fresh samples obtained in Cac buffer. Neither HLS nor proPO system obtained by centrifugation presented additional activation by the tested LPSs, including those from *E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *S. thypi*. However, the proPO obtained by lysing or centrifuging hemocytes was activated by laminarin. The proPO sample obtained by centrifuging the hemocytes was very sensitive to minute quantities of laminarin (Fig. 4). This suggests that the natural activating enzyme (6) is located inside the hemocytic granules and is also released during centrifugation. Similar to what has been reported for insect (13,21,7) and crustacean (22,25,26) proPO, activation of the shrimp proPO system was dose-dependent for laminarin (Fig. 4) up to 5 mg/ml, where an apparent saturation was observed. Laminarin-induced proPO system activation is a clear phenomenon, although the chemical variation of the laminarin preparation is important (29,22). We observed little, but significant different responses by using different laminarin lots (from Sigma No. 110H3841, 44H3924 and 73H3815). However, the maximum stimulating dose always ranged from 1 to 10 mg/ml.

While the LPSs were unable to activate the shrimp proPO samples, other chemicals (SDS, urea, methanol) had the ability to do so (Fig. 5), as reported for other arthropod species (3,13,7). Chemical activation is probably due to structural changes in the proPO molecule rather than to proteolytic cleavage. This idea was supported by the fact that SDS or methanol activation is not inhibited by soybean trypsin inhibitor (STI), while activation by exogenous propeptidase (trypsin) was completely blocked (Fig. 5). The proposed proPO activation model for crustaceans (11,25,26) involves a proteolytic cleavage which is mediated by a serine proteinase (5), namely proPO activating enzyme (6). In this work, the presence of the proPO activating enzyme was not demonstrated directly. Nevertheless, its participation and nature (serine-proteinase) are assumed since both spontaneous and propeptidase activation was inhibited by melittin and/or STI.

Even though laminarin is a strong proPO system activator

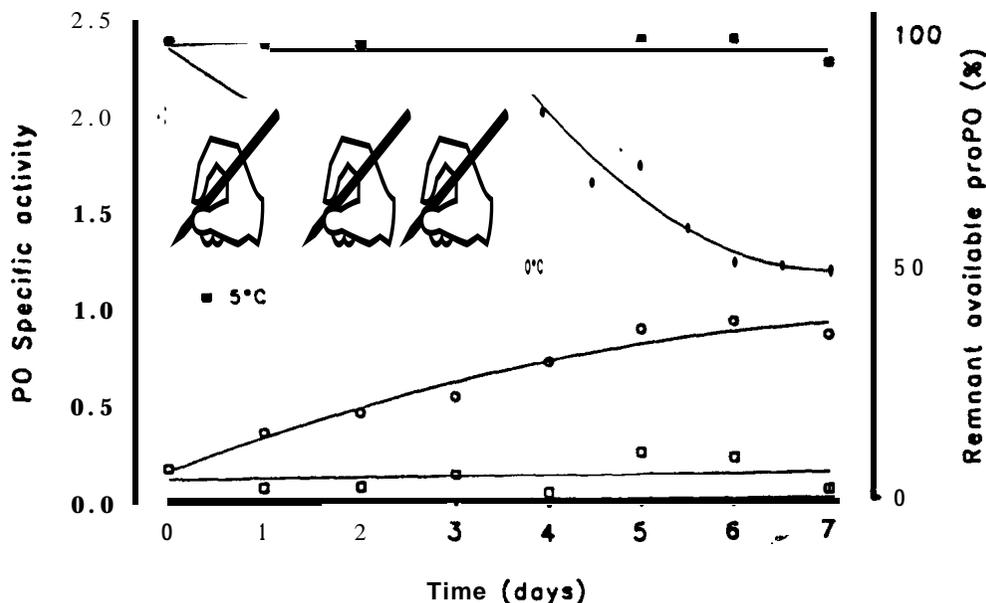


FIG. 3. Stability of the shrimp proPO system obtained in Cac buffer + melittin (50 µg/ml) at 0 and 5°C. Both PO activity (open) and remnant available proPO (filled) were determined by triplicate. The symbols represent the average of three samples.

in the brown shrimp, the LPSs tested (see above) were unable to stimulate neither the proPO system preparation obtained by centrifugation nor the HLS. Activation of the arthropod proPO system using LPS has not always been possible, and important differences can be observed among insects (16) and marine invertebrates (23). In some insect species, including *Bombyx mori* (35) and *Sarcophaga peregrina* (21), LPS does not activate the proPO system *in vitro*, while in others such as *Manduca sexta* (20) and *Locusta migratoria* (7), rapid and strong activation occurs. Thus, as in insects, the mechanism for LPS stimulation in shrimp remains unclear and is apparently dependent on other factors.

Participation of other cellular or humoral components in the shrimp proPO system has to be investigated in order to establish the mechanism of the spontaneous and elicited activation. In addition, the active PO is a sticky protein (31) making the purification task very difficult. If the highly sensitive spontaneous activation found in shrimp can be abolished by using serine-proteinase inhibitors, it should be possible to establish a routine for the purification of the proPO.

In summary, the *Penaeus* proPO system can be obtained by lysing or centrifuging the hemocytes in Cac buffer. The

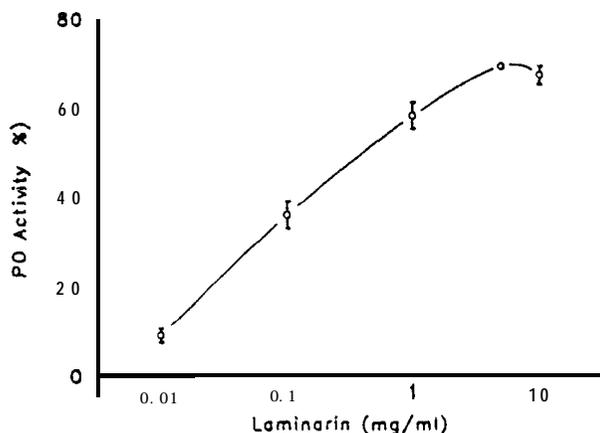


FIG. 4. Laminarin dose-dependent activation of proPO from brown shrimp hemocyte lysate. Mean ± standard error from triplicate experiments are given considering the maximum response obtained as 100%.

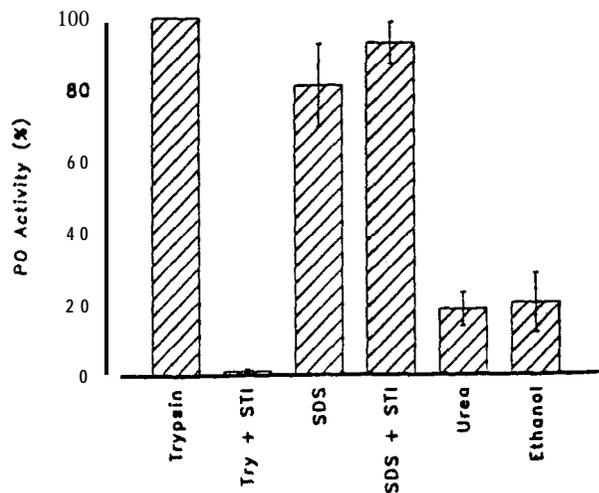


FIG. 5. Activation of the brown shrimp proPO by trypsin and other chemicals. Values (average ± standard error) from triplicate experiments are expressed considering the activation by trypsin as 100%.

shrimp proPO system showed spontaneous activation and was sensitive to minute amounts of β 1,3-glucans. Although spontaneous activation could not be related to its physiological role until now, laminarin activation supports the idea of proPO system participation in nonself recognition.

This work was partially supported by the Marine Aquaculture Program (CIBNOR, Mexico). We are grateful to F. Magallón and G. Portillo who kindly supplied the experimental animals, Dr. G. Yepiz-Plascencia (CIAD, Mexico) for critical reading of the manuscript and Dr. Roy Bowers for a grammatical review.

References

- Ashida, M. A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 11:57-65; 1981.
- Ashida, M.; Ishizaki, Y.; Iwahana, H. Activation of prophenoloxidase by bacterial cell walls or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 562-568.
- Ashida, M.; Söderhäll, K. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B:21-26; 1984.
- Ashida, M.; Yamazaki, H. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: Ohnishi, E.; Ishizaki, H., eds. *Molting and Metamorphosis*. Berlin: Springer-Verlag; 1990:239-265.
- Aspán, A.; Hall, M.; Söderhäll, K. The effect of endogenous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. *Insect Biochem.* 20:485-492; 1990.
- Aspán, A.; Scurtevan, J.; Smirh, V.J.; Söderhäll, K. Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. *Insect Biochem.* 20:709-718; 1990.
- Bréhelin, M.; Drif, L.; Baud, L.; Boemare, N. Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19:301-307; 1989.
- Brookman, J.L.; Ratcliffe, N.A.; Rowley, A.F. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem.* 19:47-57; 1989.
- Guzmán-Murillo, A.; Ochoa, J.L.; Vargas-Albores, F. The hemolytic activity in the haemolymph from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:271-275; 1993.
- Johansson, M.W.; Söderhäll, K. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.* 156B:175-181; 1985.
- Johansson, M.W.; Söderhäll, K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol. Today* 5:171-176; 1989.
- Leonard, C.; Ratcliffe, N.A.; Rowley, A.F. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *J. Insect Physiol.* 31:789-799; 1985.
- Leonard, C.; Söderhäll, K.; Ratcliffe, N.A. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* 15:803-810; 1985.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.L.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275; 1951.
- Ratcliffe, N.A. Invertebrate immunity—a primer for the non-specialist. *Immunol. Lett.* 10:253-270; 1985.
- Ratcliffe, N.A.; Brookman, J.L.; Rowley, A.F. Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Develop. Comp. Immunol.* 15:33-39; 1991.
- Ratcliffe, N.A.; Rowley, A.F.; Fitzgerald, S. W.; Rhodes, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97:183-350; 1985.
- Rowley, A.F.; Rahmer-Alla, M. Prophenoloxidase activation in the blood of *Leucophaea maderae* by microbial product and different strains of *Bacillus cereus*. *J. Insect Physiol.* 36:931-937; 1990.
- Saul, S.J.; Bin, L.; Sugumaran, M. The majority of prophenoloxidase in the hemolymph of *Manduca sexta* is present in the plasma and not in the hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.* 11:479-486; 1987.
- Saul, S.J.; Sugumaran, M. Protease mediated prophenoloxidase activation in the hemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5:1-11; 1987.
- Saul, S.J.; Sugumaran, M. Prophenoloxidase activation in the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 7:91-103; 1988.
- Smith, V.J.; Söderhäll, K. β -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Bull.* 164:299-314; 1983.
- Smith, V.J.; Söderhäll, K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Develop. Comp. Immunol.* 15:251-261; 1991.
- Söderhäll, K. The bee venom melittin induces lysis of arthropod granular cells and inhibits activation of the prophenoloxidase activating system. *FEBS Lett.* 192:10% 112; 1985.
- Söderhäll, K. Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.* 59:141-151; 1992.
- Söderhäll, K.; Cerenius, L.; Johansson, M.W. The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712:155-161; 1994.
- Söderhäll, K.; Hall, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta* 797:99-104; 1984.
- Söderhäll, K.; Smith, V.J. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. *Develop. Comp. Immunol.* 7:229-239; 1983.
- Söderhäll, K.; Unestam, T. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. *Can. J. Microbiol.* 25:406-414; 1979.
- Sugumaran, M.; Nellaippan, K. Prophenoloxidase activation by lipids. *Am. Zoo.* 31:88A; 1991.
- Vargas-Albores, F. Sistemas de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*), Ph.D. Thesis, Universidad Nacional de México.
- Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, M.A.; Ochoa, J.L. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A:299-303; 1993.
- Vargas-Albores, F.; Guzmán-Murillo, A.; Ochoa, J.L. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* HOLMES) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 104A:407-413; 1993.
- Vargas-Albores, F.; Ochoa, J.L. Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus tylirostris*) according to size. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A:1-5; 1992.
- Yoshida, H.; Ashida, M. Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 16:539-545; 1986.

CBP

Comparative Biochemistry and Physiology

AN INTERNATIONAL JOURNAL

7 February 1996

CBP Editorial Office
6371 Crescent Road
University of British Columbia
Vancouver, B.C. V6T 1Z2
Canada

Dr. Francisco Vargas-Albores
Centro de Investigacion en Nimentacion
y Desarrollo
Aptdo. Postal 1735
Hermosillo, Sonora
83000 Mexico

Manuscript number: 93 3910

T. Gollas-Galvan, J. Hernandez-Lopez and F. Vargas-Albores: **Effect of calcium on the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) prophenoloxidase system activation**

Dear Contributor:

The above manuscript has been received by the new editorial office of CBP. Your manuscript will be sent out to review and we will communicate with you again, as soon as we have had feedback from the external reviewers.

Please direct all queries concerning your manuscript to this office and make sure to include the appropriate manuscript number in all correspondence.

Thank you for submitting your manuscript to CBP.

Sincerely yours,



Peter W. Hochachka
Thomas P. Mommsen

Effect of calcium on the brown shrimp (*Penaeus californiensis*, Holmes) prophenoloxidase system activation.

Teresa Gollas-Galván⁽¹⁾, Jorge Hernández-López⁽¹⁾ and Francisco Vargas-Albores^(1,2)

(1) CIBNOR. PO Box 128; La Paz, BCS, 23000 Mexico; (2) CIAD. PO Box 1735; Hermosillo, Son; 83000, Mexico

Keywords: Shrimp immunology; **proPO** system; crustacean; laminarin; hemocytes.

Abstract

Brown shrimp (*P. californiensis*) soluble prophenoloxidase (**proPO**) system was obtained by **centrifuging** hemocytes (15,000 g) in low salt buffers. In these samples, **proPO** spontaneous activation was observed when calcium (>5 mM) was present in the buffers. Stable samples can be obtained in divalent cation-free buffer, and the solely addition of Ca^{*+} resulted in the **proPO** activation. In **contrast**, Ca²⁺ was not **able** to induce spontaneous activation on samples depleted of **proPO** activating enzyme (PPAE) obtained by passing the sample through a Blue Sepharose **column**. In addition, protease inhibitors like melittin and **STI** blocked the Ca^{*+}-induced spontaneous activation, indicating that this **cation** is required for the **proPO** proteolytic activation.

Corresponding Author: Dr. Francisco Vargas-Albores; Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Apto. Postal 1735 Hermosillo, Son. 83000 Mexico Tel/Fax: +52 (62) 80-00-58; e-mail: fvargas@cascabel.ciad.mx

Although Ca^{*+}-induced spontaneous activation was not observed with **intact** hemocytes, this **cation** was **necessary** for the activation of **proPO** by R-glucans. Plasma Ca²⁺ concentration of the brown shrimp is 8 mM, as determined by absorption spectroscopy. Thus, these results suggest that Ca^{*+} **activates** the PPAE, and then PPAE transforms the **proPO** to active form, when both proteins are **released** from the **cells** after the stimulus.

Introduction

The **proPO** system is an enzymatic **complex cascade** involved in invertebrate immune mechanisms (Ratcliffe *et al.*, 1984; Leonard *et al.*, 1985a; Söderhäll *et al.*, 1994). The major enzyme produced during **proPO** system activation is phenoloxidase (PO, o-diphenol-oxygen oxidoreductase; E.C. 1.10.3.1) which is necessary for the melanization **process** observed in response to foreign matter invading the hemocoel and during wound healing (for review see Johansson and Söderhäll, 1989b; Ashida and

Yamazaki, 1990; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994). The **proPO** system can be specifically activated by β -1,3-glucans (Ashida *et al.*, 1983; Smith and Söderhäll, 1983; Leonard *et al.*, 1985b; Vargas-Albores *et al.*, 1993; Hernández-López *et al.*, 1996), bacteria **cell walls** (Ashida *et al.*, 1983; Rowley and Rahmet-Alla, 1990), and lipopolysaccharide (**LPS**) (Söderhäll and Häll, 1984). In addition to melanization, other **cellular** activities are stimulated during **proPO** system activation, including: adhesion, encapsulation and phagocytosis (Johansson and Söderhäll, 1989a; Rantamaki *et al.*, 1991; Ratcliffe *et al.*, 1991; 1992; Zahedi *et al.*, 1992). During the activation process, PPAE has been identified as the proteinase responsible for the activation of the **proPO** and its conversion to active PO (Aspán *et al.*, 1990; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994).

The participation of Ca^{2+} in the trigger of invertebrate defense processes has been demonstrated in several models. In **crayfish** calcium is necessary for cell adhesion (Johansson and Söderhäll, 1988), and in the snail *Helix pomatia*, Ca^{2+} increases the phagocytosis rate almost 15 fold (Richards and Renwartz, 1991). However, the role of Ca^{2+} on the **proPO** system activation is still unclear. While some authors have observed that Ca^{2+} is necessary in the activating process of **proPO** in crustaceans (Ashida and Söderhäll, 1984) and insects (Ashida *et al.*, 1983; Leonard *et al.*, 1985b; Brehélin *et al.*, 1989), in other cases Ca^{2+} apparently is not needed for the **proPO** system activation (Lockey and Ourth, 1992; Nayar and Bradley, 1994). Furthermore, high concentrations of Ca^{2+} apparently stabilize the **proPO** system and prevent the spontaneous activation that is observed at low concentration of Ca^{2+} (Söderhäll, 1981; Ashida *et al.*, 1983; Leonard *et al.*, 1985b).

In **crayfish**, a proteolytic enzyme is involved in the activation of **proPO**, in turn, the proteinase activity is promoted by Ca^{2+} (Söderhäll and Häll, 1984) producing active PO. **Contrary**, in silkworm, **proPO** can be transformed by the PPAE in the absence of Ca^{2+} (Ashida *et al.*, 1983). Beside this apparently conflicting data, Ca^{2+} participation on the **proPO** system activation is assumed, and these differences may be associated with the source, extraction form, purity and other properties of the **proPO** preparation. In this work, we tested the effect of Ca^{2+} on a crude preparation of shrimp **proPO** system in order to explain the physiological role of this cation in the shrimp defense system.

Materials and methods

All chemicals were purchased from Sigma Chem. Co. The glassware was washed with Toxa-Clean (Sigma Chem. Co.) to avoid any spontaneous activation of the **proPO** system by endotoxins. For the same reason, all solutions were prepared using pyrogen-free water.

Solutions

The shrimp anticoagulant solution was prepared by adding 10 mM EDTA. Na_2 to shrimp salt solution (SSS), which corresponds to the ionic and osmotic values of shrimp hemolymph (Vargas-Albores and Ochoa, 1992): 450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/Kg. A cacodylate buffer (Cac: 10 mM sodium cacodylate, pH 7.0) was used for extraction of the **proPO** system and for determination of PO activity.

Animals

The shrimps, *Penaeus californiensis*, were grown in an experimental tide pond (Center for Biological Research, La Paz, BCS, Mexico). The animals were maintained in an aquarium ($24 \pm 4^\circ\text{C}$, salinity: 36 parts per

thousand) at least 2 days **before** the experiment. **Only** the hemolymph from intermolt, apparently healthy shrimp was **used**.

Extraction and Separation of the Hemolymph

The hemolymph was **extracted** from the pleopod base of the **first** abdominal segment **near** the genital pore. One hundred μl of hemolymph were obtained using a 0.5 ml syringe, 27 gauge needle, containing 200 μl of precooled (1 $^{\circ}\text{C}$) **anticoagulant** solution (Vargas-Albores *et al.*, 1993). The hemolymph was then **centrifuged** at 560 g for 3 **min** and the supernatant was separated.

Chemical Analysis

The total protein **content** was measured according to Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard. Calcium concentration was determined by using an absorption spectrophotometer (Buch Scientific, 200A) with acetylene (50%) in air (v/v) as **combustion** gas.

Enzymatic Activity

The phenoloxidase activity was measured spectrophotometrically (**in** triplicate) by recording the formation of dopachrome from L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). **Fifty** microliters of sample were placed in a microwell plate and 50 μl of L-DOPA were added. **After** 10 **min** of incubation at **25 $^{\circ}\text{C}$** , the optical density was **recorded** using an ELISA reader (Labsystems Uniskan II) at 492 nm. Total amount of **proPO** available (PO + **proPO**) was determined **after** sample incubation with 50 μl of trypsin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in **Cac** buffer), allowing the **proPO** activation reaction to **proceed** for 10 **min** at **25 $^{\circ}\text{C}$** . The amount of residual **inactive proPO** in samples containing **also** PO activity was calculated as total available **proPO** minus the PO activity measured **before** trypsin treatment.

proPO system preparations

Soluble samples containing shrimp **proPO** system were obtained as in (Hernández-López *et al.*, 1996) by inducing degranulation. In brief, hemolymph (200 μl) was **centrifuged** at 700 g, the cell pellet was washed by resuspending in 200 μl of **Cac** buffer and **centrifuging** at 15,900 g for 20 **sec**. Cell integrity was **verified** by microscopy and degranulation rather than lysis was **observed**. The supernatant containing the granular material was separated and used as **proPO** source.

Role of divalent ions

Effect of divalent ions (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) on the **proPO** preparations was evaluated by obtaining samples in **Cac** buffer containing one of the **cations** (20 mM) and determining PO activity. In other experiments, **crude** preparations of the shrimp **proPO** system were obtained in calcium-free **Cac** buffer. **Then**, 50 μl of sample were incubated for 30 **min** at room temperature with 50 μl of **Cac** containing different Ca^{2+} concentrations (0, 5, 10, 20, and 100 mM).

Effect of calcium in activation by trypsin

Fifty microliters of **proPO**-containing sample were incubated for 30 **min** with different calcium concentrations (5, 50 and 100 mM). **Then**, 50 μl of **trypsin** were added and incubated for 5 **min** at room temperature **before** determining PO activity. Separately, 50 μl of **proPO** sample were incubated with trypsin (50 μl) **before** the addition of different Ca^{2+} concentration and PO activity determination.

Effect of proteinase inhibitors

Melittin and soybean trypsin inhibitor (STI) were tested as inhibitor of the Ca^{2+} effect. The samples were obtained in **Cac** with (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or without melittin and incubated for 30 **min** at room temperature with Ca^{2+} (10 mM), Ca^{2+} + STI (0.2 mg/ml), trypsin (0.1

mg/ml) and trypsin-STI, before determining PO activity.

Activation by β -glucans

The samples were obtained in Ca^{2+} -free Cac buffer, and 50 μl were incubated for 30 min at room temperature with 50 μl (1 mg/ml) of laminarin (β -glucan) in presence (20 mM) or absence of Ca^{2+} . Then, PO activity was recorded.

Stability

One ml of hemolymph was obtained in 2 ml of precooled anticoagulant solution. The cell pellet was washed twice with SSS by centrifuging at 800 g. The cell pellet was resuspended in 2 ml of cacodylate calcium-free, and centrifuged 1 min at 15900 g. The supernatant was separated in four aliquots and each was diluted (1:2) with Cac buffer containing 0, 5, 40 or 100 mM of CaCl_2 . PO activity was recorded in aliquots at different times (0, 30, 60, 90 and 120).

Preparation of PPEA-free sample

Sample containing proPO was obtained from brown shrimp hemocytes in Ca^{2+} -free buffer as described above, and both PO activity and total available proPO were determined. One ml of sample was passed through an 8 ml Blue-SepharoseTM column previously equilibrated with 10 mM cacodylate buffer (pH 8.0). The column was washed with 45 ml of the same buffer and the retained material was eluted by sequentially washing the column with 0.5, 1.0 and 1.5 M NaCl. Fractions containing proPO were detected by incubating the samples with trypsin or calcium and determining their PO activity.

Results and Discussion

Previously, we reported the use of hemocyte centrifugation as an alternative method to extract proPO system (Hernández-López *et*

al., 1996). This method provides a crude proPO preparation with less contaminant unrelated proteins than the traditionally used hemocyte lysate supernatant (HLS). However the addition of CaCl_2 (20 mM) to the buffer resulted in spontaneous activation of proPO, detected as PO activity. This led us to more careful examination of the reaction.

Effect of Cations over proPO

The effect of cations on the spontaneous activation of proPO was determined by addition of 20 mM- Ca^{2+} , Mg^{2+} or Mn^{2+} to the buffer during the proPO extraction from shrimp hemocytes. Significant quantities (>30%) of active PO were detected when Ca^{2+} was present in the buffer (water or cacodylate), while the use of buffers containing 20 mM MgCl_2 or MnCl_2 resulted in a small spontaneous activation. In contrast, when the proPO system from brown shrimp was obtained with divalent cation-free buffers, spontaneous activation was not observed (Table 1). Therefore an experiment was designed to study the effect of different Ca^{2+} concentration on spontaneous activation. A proPO preparation was obtained in Ca^{2+} -free Cac buffer without spontaneous activation. Then, aliquots were incubated with different concentrations (0 to 100) of this cation. Spontaneous activation was observed from 10 to 100 mM of Ca^{2+} ($p < 0.05$) with maximum values from 50 to 100 mM. Only a small spontaneous activation was observed (Fig 1) when Mg^{2+} instead Ca^{2+} was assayed.

In other series of experiments, shrimp hemocytes were resuspended in Cac containing different Ca^{2+} concentration (0, 5, 40 and 100 mM). The proPO system was extracted by centrifuging, and a time course of PO activity (0, 30, 60, 90 and 120 min) was determined for each supernatant. As

shown in Fig 2, all samples obtained in the presence of Ca^{2+} presented spontaneous activation, whereas the samples obtained in Ca-free buffer were stable and modification of PO activity was not detected. A significant time influence was observed only in samples obtained with 5 mM Ca^{2+} (Fig 2), where 100% of activity was reached after 90 min of incubation. The samples obtained with 40 or 100 mM of Ca^{2+} showed high spontaneous activation at time zero (60%), and at 30 min proPO was not detected indicating that 100% transformation had occurred.

Although a Ca^{2+} independent spontaneous activation of proPO has been reported in several insects (Li *et al.*, 1989; Nappi *et al.*, 1991; Nappi and Seymour, 1991; Lockey and Ourth, 1992; Nayar and Bradley, 1994), other authors have reported that low Ca^{2+} concentrations (5 to 20 mM) produce proPO spontaneous activation in insects (Ashida *et al.*, 1983; Dularay and Lackie, 1985; Leonard *et al.*, 1985b) as well as in crustaceans (Söderhäll, 1981; Ashida and Söderhäll, 1984; Söderhäll and Hall, 1984). The stability of the shrimp proPO system in absence of Ca^{2+} is similar to the results obtained in the freshwater crayfish (Söderhäll, 1981; Ashida and Söderhäll, 1984; Söderhäll and Hall, 1984) where 5 mM of this cation stimulated the spontaneous activation. However, the spontaneous activation of the shrimp proPO system can not be inhibited by high Ca^{2+} concentrations, as recommended by some authors (Söderhäll, 1981; Ashida and Söderhäll, 1984; Söderhäll and Hall, 1984; Leonard *et al.*, 1985b).

Ca effect over proteolytic activation of proPO

Since Ca^{2+} has been shown to be necessary for proteolytic activation of proPO in *Blaberus craniifer* (Leonard *et al.*, 1985b) and crayfish (Ashida and Söderhäll, 1984;

Söderhäll and Hall, 1984), we assayed the effect of different Ca^{2+} concentrations on trypsin-induced proPO activation. High Ca^{2+} concentrations (100 mM) provoked a significant ($p < 0.05$) reduction of the dopachrome formation, which could be interpreted as an inhibition of the proPO spontaneous activation. However, we did not observe an inhibition higher than 40% with 100 mM of Ca^{2+} , different to Leonard *et al.* (1985b) who reported total inhibition of activity with 100 mM of Ca^{2+} . Furthermore, a similar inhibitory pattern on the dopachrome formation was observed when the Ca was added to previously trypsin-activated proPO (Fig 3). This suggests that high Ca^{2+} concentrations (50-100 mM) affect the formation of dopachrome, rather than the transformation of proPO to active PO. Thus, the brown shrimp proPO can be activated by trypsin in absence of Ca^{2+} , while the natural proteolytic proPO activation pathway apparently requires this cation.

There are evidences indicating that Ca^{2+} is involved in the proPO activating system in insects and crustaceans, despite that its action mechanism in spontaneous activation is still not clear. Söderhäll and Hall (1984) demonstrated that Ca^{2+} increases the protease activity in HLS of crayfish, and this can help to explain the role of Ca^{2+} . Even though, in some insects the action of PPAE apparently is Ca^{2+} independent (Ashida *et al.*, 1983; Li *et al.*, 1989; Nappi *et al.*, 1991; Nappi and Seymour, 1991; 1992; Lockey and Ourth, 1992; Nayar and Bradley, 1994), it is possible that in crustaceans the role of Ca^{2+} on the spontaneous activation is related to PPAE activation, rather than affecting directly the proPO transformation. Supporting this idea, we observed that the spontaneous activation of the brown shrimp proPO system induced by Ca^{2+} can be blocked by STI (Table 2). Additionally,

when the shrimp **proPO** system was obtained in **Ca²⁺** buffer containing melittin (**non-competitive** proteinase **inhibitor** and blocker of **proPO** activation (Söderhäll, 1985)), the spontaneous activation in presence of **Ca²⁺** was inhibited. Thus, while melittin prevents **proPO** system activation by blocking the PPAE, **Ca²⁺** is required by this proteolytic enzyme and the subsequent **proPO** to PO transformation.

Durrant *et al.*, (1993) purified the *Blaberus discoidalis* PPAE by passing HLS through a Blue-Sepharose column. Using this methodology, we obtained a **PPAE-free proPO** preparation, that was not retained by the column. This **PPAE-free** preparation did not show spontaneous activation by incubation with **Ca²⁺** (10-50 mM), but could be activated by incubation with trypsin (Table 3). These results confirm that **Ca²⁺** participation is associated with the activating system rather than directly to the **proPO** transformation to active PO.

Effect of Ca over dopachrome formation

Looking for the effect of **Ca²⁺** on dopachrome formation, we tested different **Ca²⁺** concentrations (0 to 100 mM) in trypsin-activated PO and other two phenol oxidizing enzymes: phenolase and tyrosinase. In all cases, the formation of dopachrome was inhibited significantly ($P < 0.05$) by 10 mM or higher **Ca²⁺** (Fig 4). Only 60% of the original (without **Ca²⁺**) shrimp PO activity was detected by using 100 mM **Ca²⁺**. Thus, it is possible that the apparent PO activity reduction, observed by using high concentrations of **Ca²⁺**, reflects an effect on dopachrome formation rather than on the **proPO** activation or PO stability.

Effect on β -glucan-induced activation

β -glucans are able to activate the crustacean **proPO** system probably by inducing protease activity as demonstrated on HLS of crayfish

(Ashida and Söderhäll, 1984). In similar form, when the brown shrimp **proPO** system obtained by centrifugation was incubated with β -glucan in presence of 20 mM **Ca²⁺**, an additional activation was recorded. However, stimulation did not occur in **Ca²⁺-free** conditions (Fig 5). Thus **Ca²⁺** is necessary for glucan-induced **proPO** activation and this result is compatible with physiological conditions where **Ca²⁺** is present.

Ca²⁺ participation during laminarin-induced stimulation was also determined in the brown shrimp intact hemocytes. When circulating cells were stimulated with laminarin in a **Ca²⁺-free** medium, PO activity was not observed indicating an endogenous **Ca²⁺** requirement. On the other hand, when hemocytes were incubated with **Ca²⁺** alone, neither PO activity nor **proPO** were detected in the cell-free supernatant. However, when hemocytes were incubated with laminarin in a **Ca²⁺-containing** medium, PO activity was detected (Table 3). In a **cell-free proPO** preparation (Table 3) a spontaneous activation (30%) was observed by incubating with **Ca²⁺**, and an additional stimulation (up to 70%) if laminarin was also added. Similar to hemocyte stimulation, laminarin alone was unable to produce PO activity in a **cell-free proPO** preparation.

proPO, Ca²⁺ and PPEA

The presence of **Ca²⁺** makes difficult to explain why the **proPO** is not activated spontaneously in the hemolymph. Moreover, both PPEA and inactive **proPO** are contained inside the hemocyte granule, and only under foreign stimulus the **proPO** can be transformed in an active form by the PPAE. Considering our results and those obtained by other authors (Ashida and Söderhäll, 1984; Söderhäll and Hall, 1984; Leonard *et al.*, 1985b; Brehélin *et al.*, 1989; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994) that

demonstrate that Ca^{2+} stimulates the proteolytic activity that transforms the proPO, it is possible to suggest the form for Ca^{2+} participation. Either Ca^{2+} is introduced to the hemocytic granule or, if already present, it is available only after the stimulus. On the other hand, it is also possible that Ca^{2+} only participates in the process after PPAE and proPO have been released from the cells, which should occur after the stimulation.

The results herein obtained suggest that proPO system is released from the cells under laminarin stimulation, but in inactive form. Outside the cell, the proPO is activated by PPAE if Ca^{2+} is present. We determined that in the brown shrimp, the concentration of Ca^{2+} in plasma is near 8 mM. Thus, it is possible that *in vivo*, the components of proPO system are released in an inactive form, and in the plasma the PPAE becomes active, and subsequently this proteinase transforms proPO to active PO.

Acknowledgment.

This work was partially supported by FONSIMAC (Project: SIMAC/94/CM-04). We are grateful to F. Magallón and G. Portillo (Marine Aquaculture Program, CIBNOR, Mexico) who kindly supplied the experimental animals, and Dr. G. Yepiz-Plascencia (CIAD, Mexico) for critical reading of the manuscript.

References.

Ashida, M., Ishizaki, Y. and Iwahana, H. (1983) Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or β -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 562-568.

Ashida, M. and Söderhäll, K. (1984) The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B, 21-26.

Ashida, M. and Yamazaki, H. (1990) Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with

special reference to its activation. In *Molting and Metamorphosis*. (Edited by Ohnishi, E. and Ishizaki, H.), pp. 239-265. Springer-Verlag, Berlin.

Aspan, A., Sturtevant, J., Smith, V. J. and Söderhäll, K. (1990) Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. *Insect Biochem.* 20, 709-718.

Brehélin, M., Drif, L., Baud, L. and Boemare, N. (1989) Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19, 301-307.

Dularay, B. and Lackie, A. M. (1985) Haemocytic encapsulation and the prophenoloxidase-activation pathway in the locust *Schistocerca gregaria* forks. *Insect Biochem.* 15, 827-834.

Durrant, H. J., Ratcliffe, N. A., Hipkin, C. R., Asp, N. A. and Söderhäll, K. (1993) Purification of the pro-phenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*. *Biochem. J.* 289, 87-91.

Hernández-López, J., Gollas-Galván, T. and Vargas-Albores, F. (1996) Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* (In press).

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1988) Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106, 1795-1803.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1989a) A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochem.* 19, 183-190.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1989b) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitol. Today* 5, 171-176.

Johansson, M. W. and Söderhäll, K. (1992) Cellular defence and cell adhesion in crustaceans. *Anim. Biol.* 1, 97-107.

Leonard, C., Ratcliffe, N. A. and Rowley, A. F. (1985a) The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *J. Insect Physiol.* 31, 789-799.

Leonard, C., Söderhäll, K. and Ratcliffe, N. A. (1985b) Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* 15, 803-810.

Li, J., Tracy, J. W. and Christensen, B. M. (1989) Hemocyte monophenol oxidase activity in

- mosquitoes exposed to **microfilariae** of *Dirofilaria immitis*. J. Parasitol. 75, 1-5.
- Li, J., Tracy, J. W. and Christensen, B. M. (1992) Phenol oxidase activity in hemolymph compartments of *Aedes aegypti* during melatonin encapsulation reactions against **microfilariae**. Develop. Como. Immunol. 16, 41-48.
- Lockey, T. D. and Ourth, D. D. (1992) Phenoloxidase activity independent of calmodulin and calcium in hemolymph of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Econ. Entomol. 85, 1069-1071.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. L., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Nappi, A. J., Carton, Y. and Frey, F. (1991) **Parasite-induced** enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 18, 159-168.
- Nappi, A. J. and Seymour, J. (1991) Hemolymph phenol oxidases in *Drosophila melanogaster*, *Locusta migratoria*, and *Austroootamobius pallipes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 748-754.
- Nayar, J. K. and Bradley, T. J. (1994) Comparative study of hemolymph phenoloxidase activity in *Aedes aegypti* and *Anopheles quadrimaculatus* and its role in encapsulation of *Brugia malayi* microfilariae. Comp. Biochem. Physiol. 109A, 929-938.
- Rantamaki, J., Durrant, H., Liang, Z., Ratcliffe, N. A., Duvic, B. and Söderhäll, K. (1991) Isolation of a 90-kDa protein from haemocytes of *Blaberus craniifer* which has similar functional and immunological properties to the 76-kDa protein from crayfish haemocytes. J. Insect Physiol. 37, 627-634.
- Ratcliffe, N. A., Brookman, J. L. and Rowley, A. F. (1991) Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. Develop. Como. Immunol. 15, 33-39.
- Ratcliffe, N. A., Leonard, C. and Rowley, A. F. (1984) Prophenoloxidase activation: Non-self recognition and cell cooperation in insect immunity. Science 226, 557-559.
- Richards, E. H. and Renwanz, L. R. (1991) Two lectins on the surface of *Helix oomatia* haemocytes: a Ca^{2+} -dependent, GalNAc-specific lectin and a Ca^{2+} -independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognises activated homologous opsonins. J. Como. Physiol. 161B, 43-54.
- Rowley, A. F. and Rahmet-Alia, M. (1990) Prophenoloxidase activation in the blood of *Leucophaea maderae* by microbial product and different strains of *Bacillus cereus*. J. Insect Physiol. 36, 93 1-937.
- Smith, V. J. and Söderhäll, K. (1983) β -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. Biol. Bull. 164, 299-314.
- Söderhäll, K. (1981) Fungal cell wall β -1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surface of crayfish hemocyte lysate. Develop. Comp. Immunol. 5, 563-573.
- Söderhäll, K. (1992) Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. Boll. Zool. 59, 141-151.
- Söderhäll, K., Cerenius, L. and Johansson, M. W. (1994) The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defense. Ann. N.Y. Acad. Sci. 712, 155-161.
- Söderhäll, K. and Häll, L. (1984) Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. Biochem. Biophys. Acta 797, 99-104.
- Vargas-Albores, F., Guzmán-Murillo, M. A. and Ochoa, J.-L. (1993) An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of Penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). Como. Biochem. Physiol. 106A, 299-303.
- Vargas-Albores, F. and Ochoa, J.-L. (1992) Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. Como. Biochem. Physiol. 102A, 1-5.
- Zahedi, M., Denham, D. A. and Ham, P. J. (1992) Encapsulation and melanization responses of *Armigeres subalbatus* against inoculated Sephadex beads. J. Invertebr. Pathol. 59, 258-263.

Tables and Figures

Table 1.

Effect of divalent cations (20 mM) on the spontaneous **activation** of the brown shrimp **proPO**. Values (average \pm st. error) are **expressed** as percent of PO activity detected, considering the activation by trypsin as 100%.

| | PO Activity (%) |
|--------------------------------------|------------------|
| Water | 1.71 \pm 0.78 |
| Water + NaCl | 0.0 |
| Water + Ca ²⁺ | 30.89 \pm 1.34 |
| Water + Mg ²⁺ | 6.80 \pm 1.90 |
| Water + Mn ²⁺ | 7.60 \pm 2.20 |
| Cacodylate buffer | 2.48 \pm 0.82 |
| Cacodylate buffer + Ca ²⁺ | 34.95 \pm 1.19 |

Table 2.

Effect of melittin on **proPO** activation **produced** by trypsin or calcium. The values are **expressed** as percent of **proPO** transformed in active PO.

| | Melittin | Melittin-free |
|--------------------------------|----------|---------------|
| Trypsin | 100 | 100 |
| Trypsin + STI | 46 | 4 |
| Ca ²⁺ (10 mM) | 4 | 25 |
| Ca ²⁺ (10 mM) + STI | 10 | 7 |

Table 3.

Effect of Ca²⁺ on **proPO** spontaneous activation in **PPAE-depleted samples** obtained by passing through a Blue-Sepharose column. Values are **expressed** as percent of PO activity detected.

| | Trypsin | Cacodylate | Ca ²⁺ (50 mM) |
|---------------|---------|------------|--------------------------|
| Original | 100 | 4 | 48 |
| PPAE depleted | 100 | 12 | 10 |

Table

Effect of Ca²⁺ on laminarin-induced proPO activation. The role of Ca²⁺ was tested in both **free-cell proPO** preparation and **intact** hemocytes. Values (Mean \pm standard error) of optical density at 492 nm are given. In parenthesis is indicated the stimulation index considering laminarin treatment as 1.

| | Laminarin | Ca (20 mM) | Laminarin + Ca ²⁺ (20 mM) |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---|
| Hemocytes | 0.230 \pm 0.023 (1.0) | 0.191 \pm 0.006 (0.8) | 0.622 \pm 0.076 (2.7) |
| Free-cell centrifugate | 0.091 \pm 0.013 (1.0) | 0.119 \pm 0.007 (1.3) | 0.159 \pm 0.003 (1.7) |

Figure 1.

Spontaneous activation of the brown shrimp proPO induced by Ca^{2+} . Samples obtained in cation-free buffer were incubated ($n=5$) with different Ca^{2+} or Mg^{2+} concentration, then their specific activity was determined (mean \pm standard error).

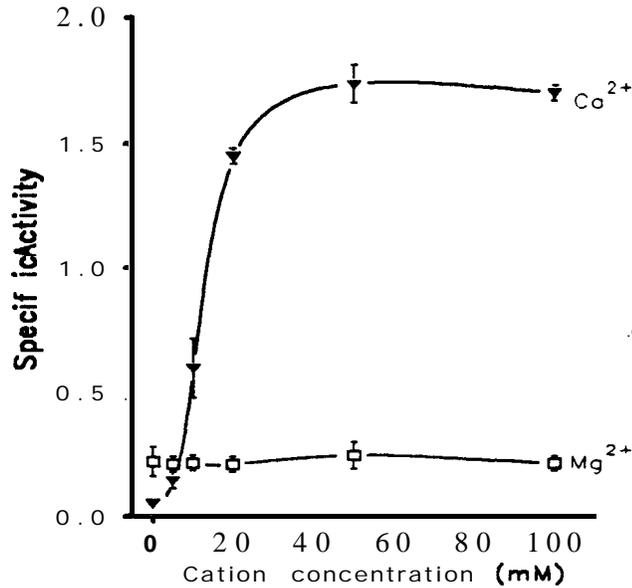


Figure 2.

Influence of time on the Ca^{2+} -induced spontaneous activation of the brown shrimp proPO. Percent (mean and standard error) of the optical density at 492 nm for five samples are shown. The maximum value was considered as 100% for each sample.

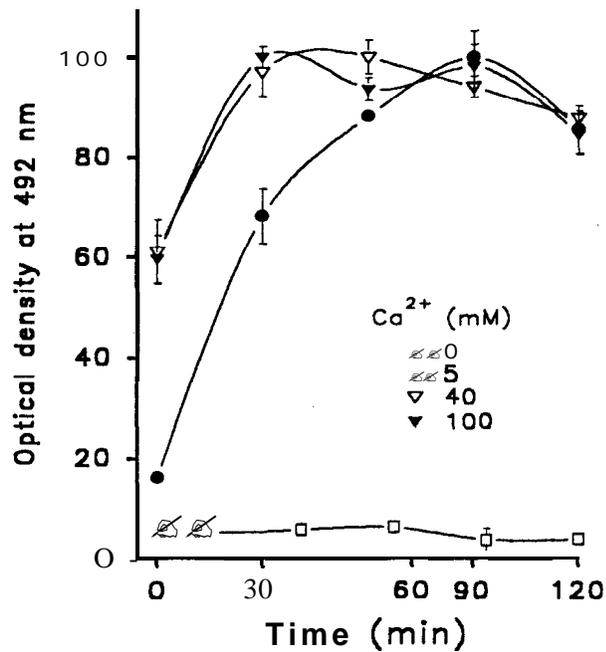


Figure 3.

Effect of calcium on the dopachrome formed by brown shrimp PO or trypsin-treated proPO. Mean (St.E.) of five determinations are shown.

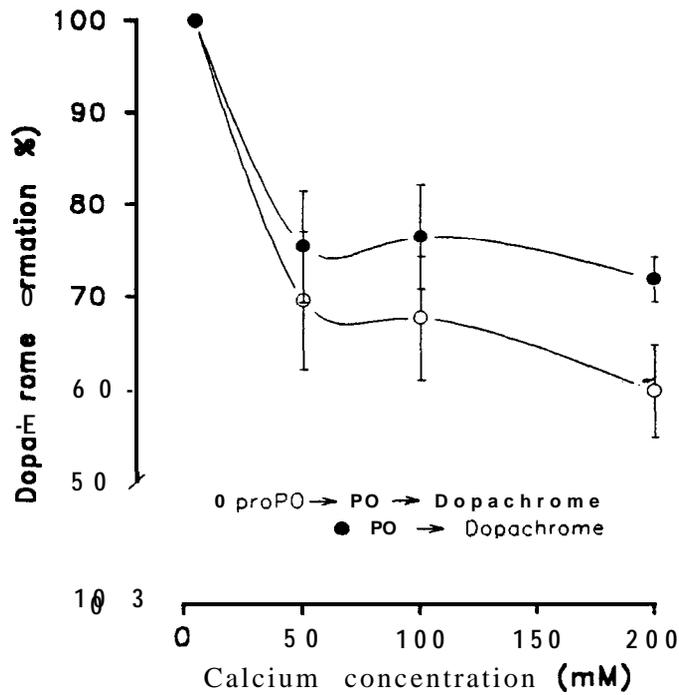


Figure 4

Effect of Ca on the dopachrome formation reaction performed by oxidizing enzymes: Phenolase, tyrosinase and brown shrimp phenoloxidase.

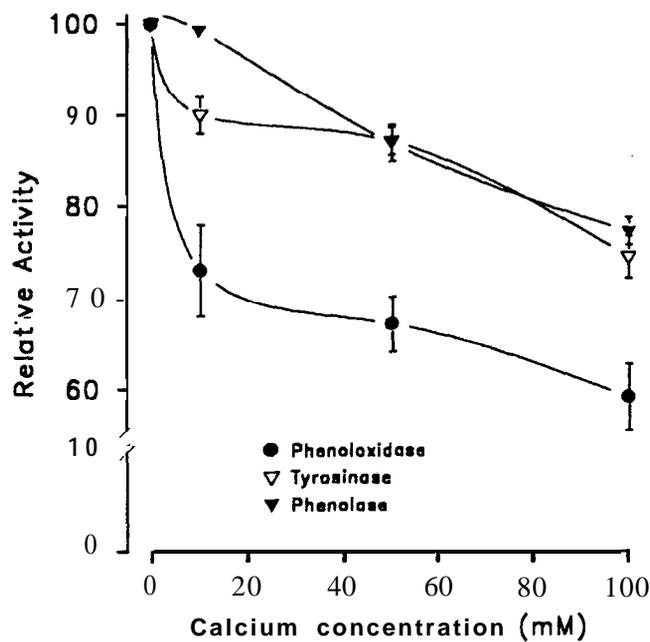


Figure 5.

Participation of calcium on the laminarin-induced proPO activation. Means (St.E.) were compared by ANOVA-1 W, and statistically significant differences (Tukey analysis) are denoted by different letters.

