



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
Discusión46
Conclusiones59
Perspectivas60
Nombres científicos61
Anexo62
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 shrimph (*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 desnaturalizantes 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 profenoloxidasas (**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 (**EAProFO**), 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 **EAProFO** (**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 μ L de muestra con 200 μ L 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 μ L 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 μ L 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

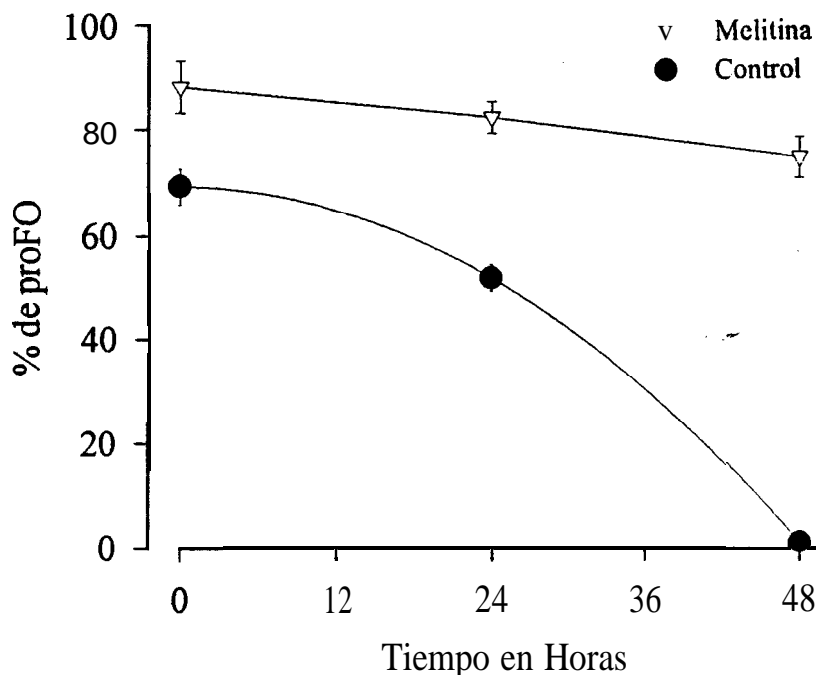


Fig. 1 Efecto de la **melitina** en la estabilidad de la **proFO** en muestras obtenidas por centrifugación. Los resultados expresados son la media de tres determinaciones. Las barras representan la desviación patrón.

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.

