

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PP2A DE *Cancer johngarhi* (Carvacho 1989), Y EVALUACIÓN DE SU USO PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁO.

Reyna de Jesús Romero Geraldo y Norma Y. Hernández Saavedra*

CIBNOR, S. C. Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apdo. Postal 128, La Paz, B.C.S.
23090, México. Tel: (52)(612)1238484. Fax: (52)(612) 1253625. nhernan04@cibnor.mxPalabras clave: *Cancer johngarhi*, PP2A, ácido okadaico.

Introducción. El cangrejo de profundidad (*Cancer johngarhi*), es una especie que se distribuye desde Isla Guadalupe, México (29°N, 118°O) hasta la Bahía de Panamá (7°N) (1). En la costa occidental de la península de Baja California y en el Golfo de California, habita fondos suaves, en poblaciones agregadas restringiéndose a áreas templado-frías (17°C-11.5°C) a profundidades entre 100 m y >200 m (2). Esta especie es comercialmente importante por el sabor y la textura de la carne de sus quelas, principalmente de los machos. Aunque desde el 2001 se ha evaluado como recurso a lo largo de su distribución en territorio nacional, en la Carta Nacional Pesquera *C. johngarhi*, se ha catalogado como una pesquería con potencial de desarrollo (3).

Por otra parte, los florecimientos algales nocivos (FAN), producidos por microalgas entre las que destacan las cianobacterias y los dinoflagelados, pueden producir toxinas como las microcistinas, nodularinas, ácido okadaico y/o dinofisistoxinas, que pueden causar efectos adversos en la salud tanto de humanos como de animales (domésticos y silvestres). El ácido okadaico (AO) inhibe la actividad de las protein-serin/treonin fosfatasas tipos 1 y 2A, que catalizan la defosforilación de residuos fosfoserin y fosfotreonin. En varios países se ha propuesto que la detección de estas toxinas se realice mediante ensayos de inhibición de la actividad de la PPasa; este método es simple y económico comparado con los usados comúnmente para la detección de toxinas en aguas y productos contaminados, como lo son el ensayo con anticuerpos (ELISA), la cromatografía líquida acoplada espectroscopia de masas (LCMS) y el bioensayo en ratón (MBA), en el que sacrifican un gran número de animales.

Considerando lo anterior, este trabajo busca proporcionar algunas bases para un aprovechamiento integral de este recurso pesquero potencial, además de proponer de fuentes alternas para la obtención de PPasas que exhiban condiciones de estabilidad y vida de anaquel superiores a las disponibles comercialmente.

Metodología. Los extractos enzimáticos se prepararon a partir de la homogenización en frío (4°C) de la glándula digestiva. Posteriormente, los extractos se sometieron a varios pasos de centrifugación, para finalmente precipitar la fracción activa con acetona fría. Durante el proceso de purificación se monitoreo el contenido de proteínas, la actividad y los perfiles electroforéticos (SDS y nativo). Se

determinó el pl, la composición y tamaño de subunidades y los efectos de: la temperatura de almacenamiento (-80, -20, 4 y 25°C) y temperatura de incubación (20 min a 20-60°C), el tiempo de ebullición (1-10 min), la estabilidad a diferentes pH (3-10) y la inhibición por AO, registrándose la actividad residual en cada caso.

Resultados y discusión. El análisis PAGE SDS (fig 1a) muestra que la preparación esta constituida básicamente por 2 bandas principales (62 y 55 kDa), que al analizar los geles PAGE-N (figs. 1b Y 1c) podrían corresponder a la subunidades estructurales de 2 enzimas diferentes, sin embargo, ello se establecerá mediante análisis de péptidos de ambas subunidades. El análisis IEF de las preparaciones PPasa de glándula digestiva, revelo un PI de 8.5. La estabilidad térmica observada es alta ya que la actividad residual se mantiene alrededor del 85% (tiempo de ebullición y diferentes temperaturas).

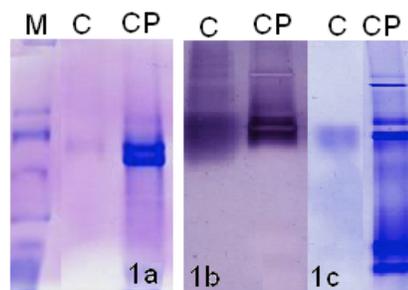


Fig. 1. Analisis electroforético de preparaciones PPasa de glandula digestiva de *C. johngarhi*. a) SDS-PAGE, b) PAGE-N, NBT, c) PAGE-N, CBB.

Conclusiones. De acuerdo a los análisis realizados, los patrones observados en las preparaciones glándula digestiva de cangrejo de profundidad en términos de actividad específica, peso molecular, termoestabilidad y punto isoeléctrico, sugieren que se trata de dos enzimas con actividad fosfatasa del tipo alcalino.

Bibliografía. 1. Carvacho, A. 1989. *Cancer johngarhi*, N. Sp. and *Cancer porteri* (Bell): comparisons and hypothesis. Proc. Biol. Soc. Wash., 102:613-619. 2. Ramirez, M., F. Arreguin, G. de la Cruz-Aguero & E. Balart. 2003. Distribucion de *Cancer johngarhi* Carvacho 1989 en la costa occidental de Baja California sur, Mexico. In: M. E. Hendrickx, ed. Contribución al estudio de los crustáceos del Pacifico Este 2. ICML, UNAM. pp. 165-168. 3. SAGARPA. 2004. Carta Nacional Pesquera.