

PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA MANGANESO-SUPEROXIDO DISMUTASA DE TRES ESPECIES DE CRUSTÁCEOS DECÁPODOS (*Dendrobranchiata*, *Peneidea*) DE INTERÉS EN ACUACULTURA.

Addis A. Sánchez-García y Norma Y. Hernández-Saavedra.
Unidad de Patología Marina. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR).
A.P. 128 La Paz, 23000. B.C.S., MÉXICO
Fax: (112) 5 36 33. email: nhernan@cibnor.mx

Palabras clave: *Mn superoxido dismutasa, Peneidos, acuacultura.*

Introducción. En años recientes, se ha intentado conocer los mecanismos de defensa de diversos invertebrados marinos sujetos a cultivo (pectínidos y crustáceos), y se han logrado conocer algunos parámetros que participan directamente en el sistema inmune innato, como son los procesos inflamatorios, y la generación de radicales intermediarios del metabolismo del oxígeno (ROS). El término ROS incluye al peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, peroxinitrito, y a los radicales superóxido e hidroxilo. Algunas de las consecuencias del daño oxidativo en las células incluyen la peroxidación de lípidos de membranas, pérdida de función en organelos, mutación e inactivación enzimática, que comprometen rápidamente la integridad y función celular. No obstante, a la par que los organismos, han evolucionado dos tipos de defensas antioxidantes. Las no-enzimáticas incluyen: β -caroteno, a. ascórbico, hidroquinonas, α -tocoferol, flavonoides, y glutatión; y las enzimáticas: glutatión reductasa, peroxidasa catalasa, y la superóxido dismutasa. De esta forma, y dada la importancia de la superóxido dismutasa en la eliminación de radicales superóxido, así como la participación de los ROS en la respuesta inmune innata en los invertebrados, es importante conocer y caracterizar la enzimas de tipo SOD presentes en peneidos, para determinar su importancia y participación en el sistema inmune, y al mismo tiempo determinar cuales son los factores ambientales que determinan y/o influyen su actividad como un mecanismo secundario en la defensa inmune, principalmente en organismos sometidos a cultivo.

Metodología. Se prepararon homogenizados de músculo por maceración, utilizando un mortero en baño de hielo. La fase soluble se separó mediante centrifugación a 14000xg. Posteriormente, se realizó una precipitación térmica (65°C) seguida por precipitaciones escalonadas con sulfato de amonio. El precipitado de 65% se dializó vs. tampón de fosfatos, purificándose las enzimas mediante cromatografía de quelatos. Las fracciones se analizaron mediante PAGE desnaturizante y nativa; la actividad específica se determinó en líquido y gel mediante el método del NBT.

Resultados y discusión. A través del proceso de precipitación seriada con sulfato de amonio se obtuvieron 4 fracciones (Figura 1), presentándose en la del 65% de

saturación (líneas 3) la mayor parte de la actividad SOD. En las fracciones de 85% (líneas 4) se observa una mancha de actividad que, mediante análisis de inhibición e inactivación, se determinó no corresponde a enzimas del tipo SOD (la GDH da reacción positiva con tinción NBT).

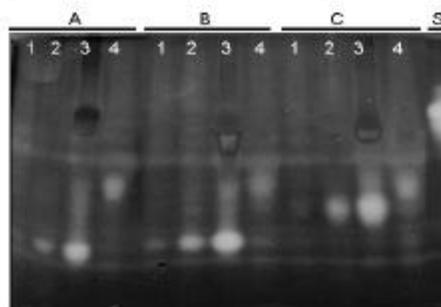


Figura 1. PAGE nativa teñida mediante la técnica del NBT. Paneles: A, *Litopenaeus stylirostris*; B, *L. vanammei* y C, *Farfantepenaeus californiensis*. Líneas (pasos de precipitación con sulfato de amonio): 1, pp 30%; 2, 50%; 3, 65% y 4, 85%.

Mediante la cromatografía de quelatos se logró purificar la MnSOD de las tres especies de camarón estudiadas, eluyendo al 70% del gradiente utilizado (Figura 2).

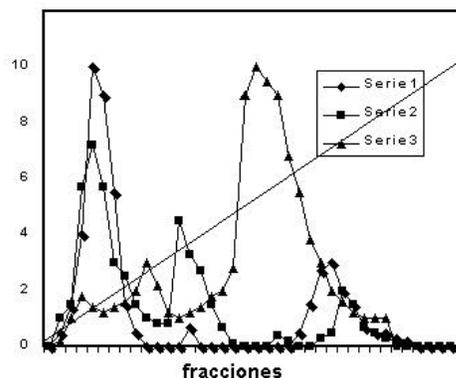


Figura 2. Cromatografía IMAC Superosa HR/cobre. Series: 1, *L. stylirostris*; 2, *L. vanammei*, y 3. *F. californiensis*.