

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO A.C.**



CIAD

“Caracterización de la Ruta Metabólica de Degradación de Adenosina Monofosfato en Manto de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) del Golfo de California.”

POR:

ENRIQUE MÁRQUEZ RÍOS

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS
DE ORIGEN ANIMAL**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Diciembre del 2006

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del M. en C. Enrique Márquez Ríos, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias, dentro del Programa de Doctorado en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director de Tesis

Dra. Marina Ezquerro Brauer

Dra. Teresa Gollas Galvan

Dra. Etna Aída Peña Ramos

Dr. Javier Castillo Yáñez

Dr. Fernando Luís García-Carreño

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD,A.C.).

La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del Director o Directora de tesis.

Dr. Alfonso Gardea Bejar
Director General
C.I.A.D.,A.C.

DEDICATORIA

A MI HIJA ALONDRA

Por ser lo más grande y valioso que me ha dado la vida, por ser mi motivación para seguir alcanzando metas. Desde tu llegada mi vida ha cambiado y hoy que te tengo a mi lado de nuevo me haces el padre más feliz del mundo, te amo con todo mi corazón, siempre estaré a tu lado.....

A MIS PADRES

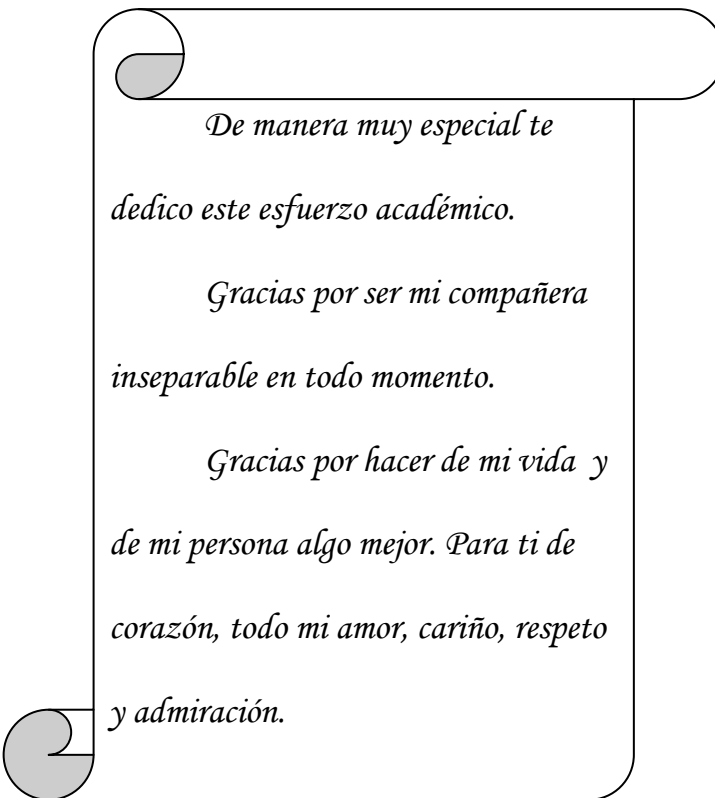
Martha Elvia y José Luís por darme todo su apoyo y confianza no solo en esta etapa de mi vida, sino en todas las que he pasado. Este triunfo no es solo mío sino también de ustedes. Les dedico con todo mi corazón el esfuerzo realizado en este trabajo para cumplir una meta más en mi vida. Gracias, sin su apoyo esto hubiera sido muy difícil.

A MIS HERMANOS

José Luís, Francisco Javier, Ramona y Lupita por estar siempre conmigo, por brindarme su amistad incondicionalmente y por confiar siempre en mí. Me siento muy orgulloso de ustedes, no sé a quien agradecer el tenerlos como hermanos. A quien agradezco?, a dios?, a mis padres?, a la casualidad?. Con toda mi admiración y respeto, esto fue por ustedes.....

A MIS AMIGOS:

Gracias

A MI ESPOSA:

*De manera muy especial te
dedico este esfuerzo académico.*

*Gracias por ser mi compañera
inseparable en todo momento.*

*Gracias por hacer de mi vida y
de mi persona algo mejor. Para ti de
corazón, todo mi amor, cariño, respeto
y admiración.*

AGRADECIMIENTOS

Al centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, AC) en especial al Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal por facilitarme sus instalaciones y todo lo necesario para la realización de mi tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca de doctorado durante mis estudios.

A mi director de tesis Dr. Ramón Pacheco Aguilar por contribuir en gran medida en mi formación académica y humana. Todo mi respeto, admiración y el mayor de los reconocimientos por su profesionalismo y humanidad. Gracias por su amistad.

Asimismo, agradezco de todo corazón y con la más alta de las admiraciones a todos los integrantes de mi comité de tesis, Dra. Marina Ezquerro Brauer, Dra. Teresa Gollas Galvan, Dra. Aída Peña Ramos, Dr. Javier Castillo Yáñez y Dr. Fernando Luís García Carreño, quienes con sus excelentes contribuciones durante el desarrollo de mi trabajo de tesis enriquecieron el presente trabajo de investigación.

Al cuerpo técnico y de apoyo del laboratorio de bioquímica y calidad de productos pesqueros integrado por las fabulosas chicas súper poderosas, las Maestras en Ciencias María Elena Lugo, Guillermina García y Gisela

Carvallo por su siempre disponibilidad y buena atención hacia mi trabajo. Muchas gracias por sus atinados comentarios a mi trabajo de tesis, un sincero y muy especial agradecimiento para ustedes, muchas gracias por todo.....

Al laboratorio de bioquímica de proteínas del estrés bajo la dirección de la Dra. Elisa Valenzuela, muchas gracias Dra. por ofrecerme sus instalaciones, sus equipos, reactivos y hasta personal de apoyo como la M. en C. Ciria Figueroa, sin duda una gran maestra, gracias Ciria por su apoyo practico, pero sobre todo teórico en este trabajo. Un agradecimiento muy especial para ustedes.

A Mónica Villegas Osuna por su apoyo técnico, pero sobre todo personal en mi estancia doctoral en este centro. Muchas gracias por todo moniquita, un agradecimiento muy especial para ti.

A la M. en C. María del Carmen Granados por su apoyo técnico.

A mis compañeros de posgrado de la CTAOA, para quienes ya se han ido y para los que se quedan, un agradecimiento muy especial para ellos, mi segunda familia; Victor Ocaño, Javier Castillo, Azucena Puente, Juan Antonio Cortes, Santiago Valdez, Hilda Gracia, Celia García, Willy Torres, Angélica Ávila y Adaly Romero, por aquellos momentos que compartimos.

Coordinación de Docencia: Ana Isabel Escobedo, Héctor Galindo, Laura García y Verónica Araiza. De igual forma, le agradezco a Héctor Cota (Don Héctor).

Al personal de biblioteca: L.B. María Magdalena Vallejo Sánchez, Fernando Alejo Leyva Livshin y muy especialmente a mis finas, y distinguidas amistades como lo son Luís Francisco Conde Ortiz y Gerardo Reyna Cañez.

Al personal de seguridad, Cuate, Quintana, Moisés y Don Toño.

CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Pesquería del Calamar Gigante.....	3
Características Generales del Calamar Gigante.....	3
Cambios Bioquímicos Posmortem.....	5
El ATP en el Metabolismo Posmortem.....	8
El Índice K como Indicador para Evaluar Frescura.....	11
Enzimas Endógenas Participantes en la Degradación del ATP y sus Productos de Degradación.....	13
Adenosina Monofosfato Deaminasa.....	14
Papel Fisiológico de la AMP Deaminasa.....	16
Regulación de AMP Deaminasa.....	18
Peso molecular y Estructura de la AMP Deaminasa.....	19
5'-nucleotidasa.....	20
Papel Fisiológico de la 5'-nucleotidasa.....	21
Regulación de la 5'-nucleotidasa.....	22
Peso Molecular y Estructura de la 5'-nucleotidasa.....	23
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Obtención de Muestra.....	25
Muestra para la Cuantificación de Nucleótidos y Nucleósidos.....	25
Cuantificación de Nucleótidos y Nucleósidos.....	25
Purificación de AMP Deaminasa.....	26
Determinación Actividad.....	26
Diagrama de Flujo de Purificación.....	27
Preparación del Extracto Crudo.....	28

Cromatografía en Celulosa Fosfato.....	28
Cromatografía en Q-Fast.....	28
Cromatografía en 5'-AMP Sefarosa.....	29
Purificación de 5'-nucleotidasa.....	29
Determinación de Actividad.....	29
Diagrama de Flujo de Purificación.....	30
Preparación del Extracto Crudo.....	31
Precipitación con Sulfato de Amonio.....	31
Cromatografía en Concanavalina A.....	31
Cromatografía en 5'-AMP Sefarosa.....	32
Análisis de Pureza.....	32
Electroforesis.....	32
SDS-PAGE y PAGE nativo.....	32
Cuantificación de Proteína.....	33
Absorbancia a 280 nm.....	33
Método de Bradford.....	33
Caracterización Bioquímica.....	33
Peso Molecular (PM).....	33
Punto Isoeléctrico (pI).....	34
Efecto del pH.....	34
pH óptimo de actividad.....	34
Estabilidad al pH.....	34
Efecto de la Temperatura.....	35
Temperatura óptima de actividad.....	35
Estabilidad térmica.....	35
Características Cinéticas de las Enzimas.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
Cuantificación de ATP y sus Productos de Degradación.....	37
Purificación de AMP Deaminasa del Manto de Calamar Gigante.....	44
Caracterización de AMP Deaminasa.....	51
SDS-PAGE, PAGE nativo y Filtración en Gel.....	51

Punto Isoeléctrico.....	54
Temperatura Óptima de Acción.....	56
Estabilidad a la Temperatura.....	56
pH óptimo de Acción.....	58
Estabilidad al pH.....	61
Efecto del KCl.....	61
Efecto del ATP.....	63
Efecto del ADP.....	66
Cinética.....	68
Purificación de 5'-nucleotidasa del Manto de Calamar Gigante.....	71
Caracterización de 5'-nucleotidasa.....	77
SDS-PAGE y Filtración en Gel.....	77
Punto Isoeléctrico.....	79
Temperatura Óptima de Acción.....	81
Estabilidad a la Temperatura.....	81
pH Óptimo de Acción.....	81
Estabilidad al pH.....	85
Efecto del NaCl.....	85
Efecto del MgCl ₂	88
Efecto del CaCl ₂	88
Efecto del ATP.....	91
Efecto del ADP.....	93
Cinética.....	95
CONCLUSIONES.....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Pag
Figura 1	Capturas de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en el Golfo de California en México.....	4
Figura 2	Distribución geográfica de los principales puntos de capturas de calamar gigante <i>Dosidicus gigas</i> a nivel mundial.....	6
Figura 3	Morfología del calamar gigante.....	7
Figura 4	Degradación aeróbica y anaeróbica del glucógeno en el músculo de pescado.....	9
Figura 5	Principales rutas de degradación del ATP en la bioquímica posmortem de especies marinas.....	12
Figura 6	Principales enzimas responsables de la degradación de ATP hasta hipoxantina.....	15
Figura 7	Degradación del ATP y sus productos durante las primeras 24 horas posmortem de manto de calamar almacenado en hielo.....	38
Figura 8	Degradación del ATP y sus productos en manto de calamar gigante almacenado en hielo.....	40
Figura 9	Comportamiento de valor K e Hx durante las primeras 24 h posmortem en manto de calamar gigante almacenado en hielo.....	41
Figura 10	Comportamiento del valor K e Hx en manto de calamar gigante almacenado en hielo.....	43
Figura 11	Cromatografía en celulosa fosfato.....	46
Figura 12	SDS-PAGE durante purificación de AMP deaminasa.....	47
Figura 13	Cromatografía en Q sefarosa fast flow.....	49
Figura 14	Cromatografía en 5'-AMP sefarosa.....	50
Figura 15	PAGE nativo de AMP deaminasa.....	52
Figura 16	Estimación del peso molecular nativo de AMP deaminasa en superdex 200.....	53

Figura 17	Isoelectroenfoque en fast system de AMP deaminasa purificada del manto de calamar gigante.....	55
Figura 18	Temperatura óptima de acción de AMP deaminasa purificada del manto de calamar.....	57
Figura 19	Estabilidad a la temperatura de AMP deaminasa.....	59
Figura 20	pH óptimo de acción de AMP deaminasa.....	60
Figura 21	Estabilidad al pH de AMP deaminasa.....	62
Figura 22	Efecto del KCl sobre la actividad AMP deaminasa.....	64
Figura 23	Efecto del ATP sobre la actividad AMP deaminasa.....	65
Figura 24	Efecto del ADP sobre la actividad AMP deaminasa.....	67
Figura 25	Efecto de la concentración de AMP sobre la actividad AMP deaminasa.....	70
Figura 26	Cromatografía en concanavalina A	74
Figura 27	SDS-PAGE durante purificación de 5'-nucleotidasa.....	75
Figura 28	Cromatografía en 5'-AMP sefarosa.....	76
Figura 29	Estimación del peso molecular nativo de 5'-nucleotidasa en superdex 200.....	78
Figura 30	Isoeléctroenfoque en fast system de 5'-nucleotidasa.....	80
Figura 31	Temperatura óptima de acción de 5'-nucleotidasa.....	82
Figura 32	Estabilidad a la temperatura de 5'-nucleotidasa.....	83
Figura 33	pH óptimo de acción de 5'-nucleotidasa.....	84
Figura 34	Estabilidad al pH de 5'-nucleotidasa.....	86
Figura 35	Efecto del NaCl sobre la actividad 5'-nucleotidasa.....	87
Figura 36	Efecto del MgCl ₂ sobre la actividad de 5'-nucleotidasa...	89
Figura 37	Efecto del CaCl ₂ sobre la actividad de 5'-nucleotidasa...	90
Figura 38	Efecto del ATP sobre la hidrólisis de AMP por 5'-nucleotidasa.....	92
Figura 39	Efecto del ADP sobre la hidrólisis de AMP por 5'-nucleotidasa.....	94
Figura 40	Efecto de la concentración de AMP sobre la actividad 5'-nucleotidasa.....	96

Figura 41	Efecto de diferentes concentraciones de sustrato IMP sobre la actividad 5'-nucleotidasa.....	98
-----------	--	----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	titulo	Pag
Cuadro 1	Ensayo de actividad de la AMP deaminasa	27
Cuadro 2	Ensayo de actividad para la 5'-nucleotidasa	30
Cuadro 3	Cuadro de purificación de AMP deaminasa del manto de calamar gigante	45
Cuadro 4	Cuadro de purificación de 5'-nucleotidasa	73

RESUMEN

La degradación ATP y sus productos en el calamar gigante es sumamente rápida, donde la conversión de ATP hasta AMP ocurre en las primeras 24 h posmortem, por consiguiente las diferencias entre los patrones de degradación en organismos marinos estriba en la degradación de AMP hasta Hx. Con la finalidad de estudiar y comprender la degradación de estos compuestos adenilados se procedió a la cuantificación de estos metabolitos en las primeras horas posmortem y durante 15 días de almacenamiento en hielo, asimismo se aislaron y se caracterizaron las enzimas responsables de la degradación de AMP en el manto de calamar.

En el presente estudio la concentración de ATP en manto de calamar gigante disminuyó de 6.54 $\mu\text{mol/g}$ a 0.41 $\mu\text{mol/g}$ en las primeras 24 h posmortem para finalizar en 0.07 $\mu\text{mol/g}$ después de 15 días de almacenamiento en hielo. Este nucleótido se degradado principalmente a Hx, obteniéndose valores de 3.56 y 6.85 $\mu\text{mol/g}$ para el día 1 y 15 de almacenamiento, respectivamente. La acumulación de Hx fue lineal en las primeras 24 h, causando con esto un comportamiento lineal del valor K, siendo este lineal solo en las primeras 24 h, para después mostrar un comportamiento hiperbólico.

La enzima AMP deaminasa purificada del manto de calamar mostró un pI de 5.76, un PM nativo de 180 kDa y conformada por dos subunidades de 87 kDa. Los resultados sugieren que la enzima es un homodímero, cuyas subunidades unidas por interacciones no covalentes. Respectivamente sus óptimos de pH y temperatura fueron de 6.0 y 35 °C. El K^+ actúo como un efector negativo de la enzima; el ATP como activador en concentraciones superiores a 2 mM, y el ADP en el rango de 0 a 2 mM. La AMP deaminasa presento un comportamiento cinético sigmoidal con una K_m de 13 mM, una V_{max} de 1.16 μM de IMP/min/mg de proteína, una K_{cat} de 3.48 moles de IMP s^{-1} y una eficiencia catalítica de 267.69 $[(\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}]$.

La enzima 5'-nucleotidasa mostró un pI de 3.6-3.8, con un peso molecular nativo de 107 kDa, y conformada por subunidades de 33 kDa. Los

resultados sugieren una estructura homotrimérica, con subunidades unidas por interacciones no covalentes. Sus óptimos de pH y temperatura fueron 4.5 y 50 °C, respectivamente. Las sales de Na^+ , Mg^{+2} y Ca^{+2} actuaron como activadores de la enzima, siendo la mejor el MgCl_2 , aumentando un 60 % su actividad. El ATP activó la enzima en todo el rango de estudio (0 - 4 mM), mientras que en presencia de ADP, la actividad enzimática se mantuvo sin cambio en el rango de 0 – 0.4 mM; a concentraciones mayores la actividad aumentó de 0.09 a 0.19 U/mg. La enzima 5'-nucleotidasa mostró un comportamiento cinético hiperbólico con un valor de K_m de 1.49, V_{max} de 0.29 μM de P_i /min/mg de proteína, K_{cat} de 0.5171 moles de $\text{P}_i \cdot \text{s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica de 356.62 $[(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$. Su eficiencia fue mayor que la obtenida para AMP deaminasa. El comportamiento sigmoidal de la AMP deaminasa la pone en desventaja catalítica sobre 5'-nucleotidasa. A bajas concentraciones de AMP, la actividad de AMP deaminasa es despreciable asumiendo con esto una predominancia en la defosforilación de AMP por la 5'-nucleotidasa.

La enzima 5'-nucleotidasa aislada de calamar gigante posee mayor afinidad sobre AMP que para IMP como sustrato. Para este último sustrato, la enzima mostró un K_m de 6.34, una V_{max} de 0.19 μM de P_i /min/mg de proteína, una K_{cat} de 0.3388 y una eficiencia catalítica de 53.44, 6.7 veces menor que para AMP sugiriendo con esto una 5'-nucleotidasa cN-I.

INTRODUCCIÓN

Uno de los cambios más relevantes en la bioquímica posmortem de organismos marinos es la degradación del ATP y sus productos [ATP (adenosina trifosfato) → ADP (adenosina difosfato) → AMP (adenosina monofosfato) → IMP (inosina monofosfato → HxR (inosina) → Hx (hipoxantina)], los cuales son utilizados para la determinación del índice (IK) o valor K. Este último es un indicador de frescura para un gran número de especies marinas (Ehira y Uchiyama, 1987; Saito y col., 1959).

En la mayoría de los peces, el ATP se degrada rápidamente a IMP dentro de las primeras 24 horas posmortem. Posteriormente, el IMP se transforma paulatinamente a HxR por la acción de la enzima 5'-nucleotidasa, ocasionando un incremento lineal de índice K con el tiempo. Por otra parte, en la mayoría de invertebrados el ATP no se transforma a IMP, sino a AMP. Este último nucleótido se degrada posteriormente a adenosina (Ado) o IMP, mediante la acción correspondiente de las enzimas 5'-nucleotidasa o AMP deaminasa (Picher y col., 2003)

Morán (2002) reportó que el músculo de calamar gigante del Golfo de California (*Dosidicus gigas*) no acumulo AMP ni IMP, sino Hx en las primeras 24 horas posmortem, generando con ello un índice K de 70 % al término del primer día de almacenamiento. Lo anterior indica una actividad enzimática elevada de las enzimas implicadas en la degradación del ATP y sus productos en comparación a los peces, sugiriendo que el IK no es un buen indicador de frescura para esta especie en particular, al no seguir el comportamiento lineal esperado característico de los peces.

El patrón de degradación del ATP varía entre las especies. En algunos invertebrados, como almejas y calamares, la degradación del AMP puede ser vía IMP o vía Ado (Hiltz y col., 1974). Los estudios realizados por Morán (2002), demostraron la presencia tanto de IMP como de Ado, ambas en cantidades considerablemente bajas en comparación a otras especies marinas estudiadas.

La sola cuantificación de estos metabolitos no es suficiente para concluir sobre la principal ruta metabólica de degradación de AMP en el músculo de *Dosidicus gigas*, por lo que en el presente estudio se plantea la caracterización bioquímica y cinética de las enzimas AMP deaminasa y 5'-nucleotidasa, responsables de la conversión de AMP a HxR ya sea vía IMP o ADO, para lograr un mayor entendimiento sobre la degradación de AMP en manto de *Dosidicus gigas*. El conocimiento de los parámetros cinéticos de ambas enzimas, tales como K_m , y eficiencia catalítica, determinará cual es la ruta predominante de degradación del AMP en la especie de estudio.

ANTECEDENTES

Pesquería del Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*)

En México, el recurso calamar esta compuesto por especies de los géneros *Dosidicus*, *Loligo*, *Lolliguncla*, *Loliolopsis*, *Illex*, *Ommastrophes* y *Symplectoteuthis*. La mayoría se pesca en forma incidental y solamente el calamar gigante constituye la pesquería con un grado de desarrollo importante en el Pacífico norte de México. La pesca del calamar gigante en el Golfo de California empezó en 1974 con la operación de una pequeña flota artesanal, la cual pescaba de 2 a 3 meses durante el verano, cuando el stock se encontraba cercano a la costa. Las capturas eran reducidas y se destinaban solo a consumo local (Ehrhardt y Col., 1982).

Esta especie se explota comercialmente a partir de finales de la década de los 80's. Tradicionalmente, la región noroeste se caracteriza por tener concentrada su actividad pesquera en especies como camarón, sardina, atún y otras especies menores. No fue sino hasta la caída del precio del camarón cuando los cooperativistas y pescadores consideraron al calamar como un recurso pesquero viable (De la Rosa, 1992).

Las capturas de calamar presentan variaciones significativas a través del tiempo, siendo un recurso oceánico altamente migratorio que se presenta de manera intermitente a partir de 1979 (Figura 1) (Anuario Estadístico de Pesca, 2005).

A pesar de la problemática de esta pesquería, empresas procesadoras establecidas en el noroeste del país dedican grandes esfuerzos para aprovechar este recurso, exportando sus productos a los mercados asiático y europeo (Ehrhardt y Col., 1982).

Características Generales del Calamar Gigante

La especie se distribuye en el Océano Pacífico oriental desde la frontera entre México y los Estados Unidos de Norteamérica hasta Chile

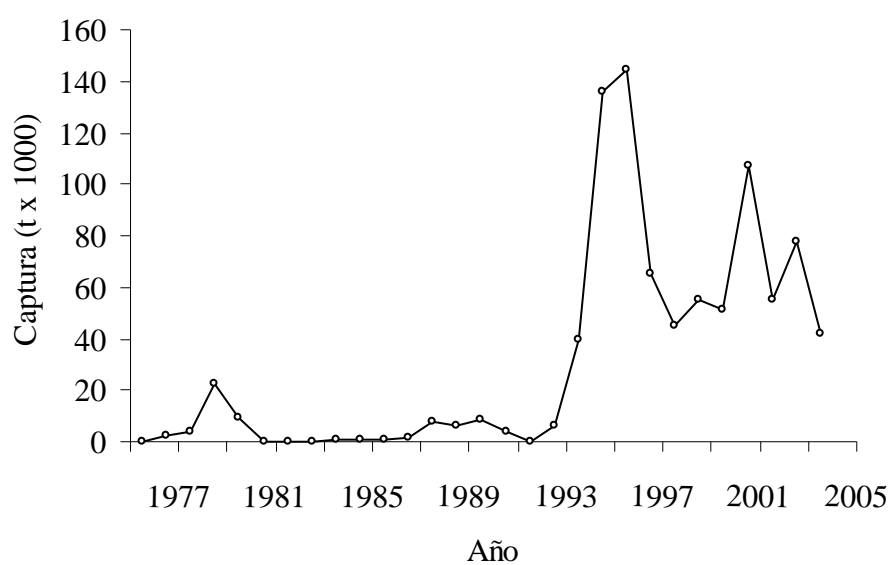


Figura 1. Capturas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California, México.

Fuente: Anuario Estadístico de Pesca, 2005.

(Figura 2). En la columna de agua se moviliza desde la superficie hasta a más de 400 m de profundidad. Sus concentraciones mayores se asocian a zonas de surgencias ricas en nutrientes, que sostienen especies que conforman su dieta básica (Suda, 1973).

El calamar gigante tiene un ciclo de vida corto, de máximo dos años. Presenta alta tasa de crecimiento, alcanzando tallas de alrededor de los 87 cm de longitud de manto (LM) y peso máximo de 13 Kg (Figura 3) (Hernández-Herrera y Col., 1998). De la Rosa y col. (1992), registraron organismos con una longitud máxima de 97 cm de longitud de manto y peso entero de 37 Kg.

La especie presenta varios eventos de desove, pero los más importantes por su magnitud ocurren en verano e invierno. Los cambios en las condiciones oceanográficas en el Golfo de California y aguas del Pacífico tienen gran influencia en la determinación de eventos reproductivos (Hernández-Herrera y Col., 1998).

Cambios Bioquímicos Posmortem

Los cambios bioquímicos posmortem que presentan los productos pesqueros están directamente relacionados con la reducción en la calidad de su músculo. Estos comienzan a presentarse inmediatamente después de su captura. Los primeros que se observan son en apariencia, olor, textura y sabor (Huss, 1995). Estos cambios se deben a que las defensas naturales del organismo disminuyen y, en consecuencia, el tejido se vuelve más sensible al deterioro. Las principales causas son la actividad enzimática endógena, la actividad microbiana y la oxidación lipídica (Pérez, 1985).

Dentro del período entre la muerte de un animal y su consumo ocurren cambios bioquímicos y fisicoquímicos. Este proceso se divide en tres etapas, a saber: a) el estado prerigor, en el cual el músculo es blando y se caracteriza bioquímicamente por la caída en los niveles de ATP y creatina-fosfato (o arginina-fosfato en el caso de algunos moluscos como el calamar), así como por la activación de la glucólisis anaerobia, b) la rigidez o

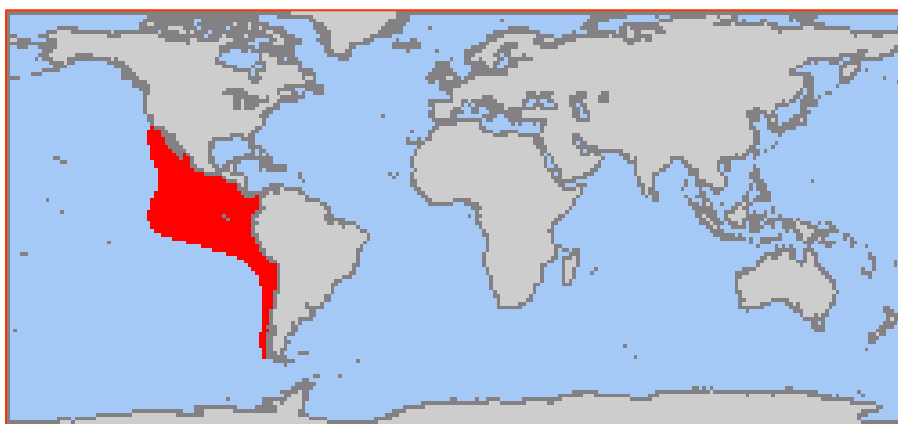


Figura 2. Distribución geográfica de los principales puntos de capturas de calamar gigante *Dosidicus gigas* a nivel mundial.

Fuente: Nigmatuli y col., 2001.

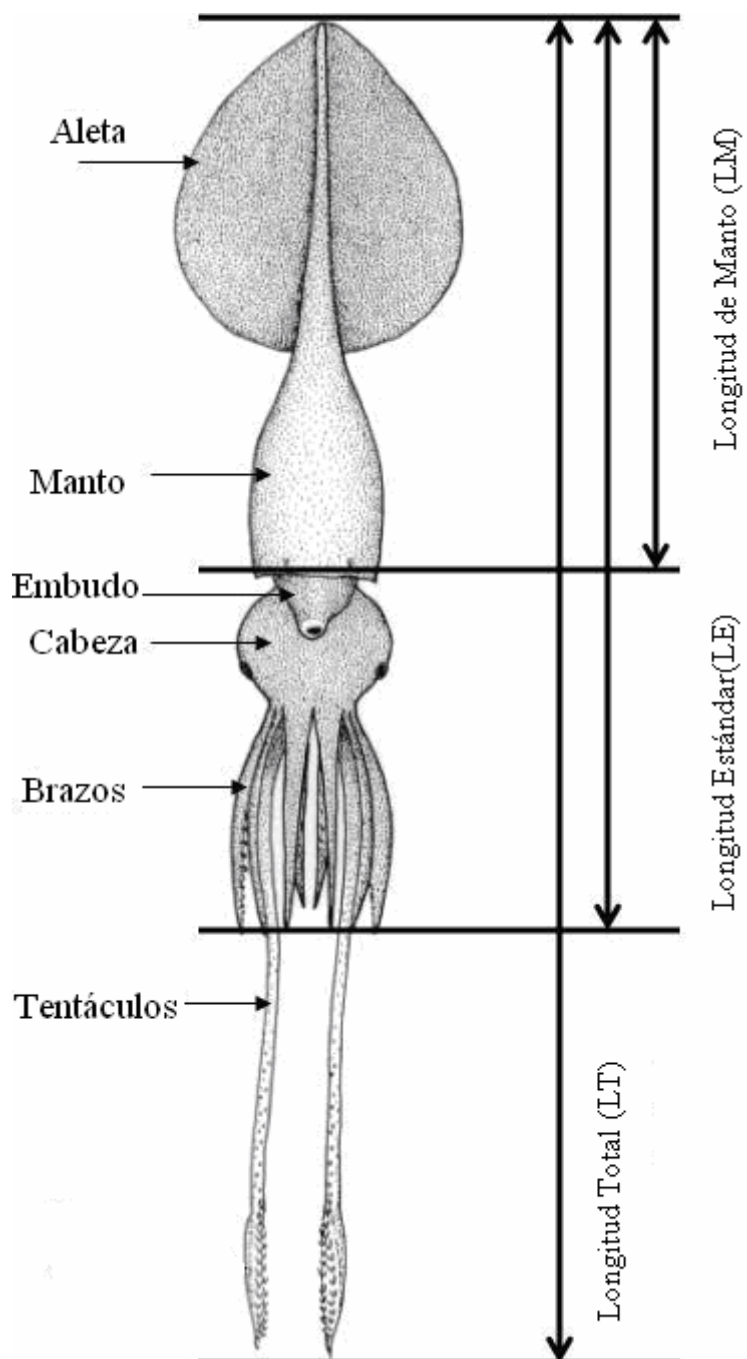


Figura 3. Morfología del calamar gigante.

Fuente: Nevárez-Martínez, 2000.

rigor mortis, el cual normalmente ocurre entre las 8 y 12 h posmortem, aunque en productos marinos puede ocurrir incluso entre 1 y 7 h, y c) el estado posrigor, en el cual el músculo adquiere una blandura similar a aquella que poseía previa al rigor.

Una vez que el animal ha muerto cesa la circulación sanguínea resultando en una serie de cambios complejos dentro del músculo. El efecto más inmediato es la interrupción del abastecimiento de oxígeno, lo cual resulta en la incapacidad del músculo para sintetizar ATP aeróbicamente debido a que los mecanismos del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se ven afectados por la ausencia de oxígeno (Haard, 1995; Eskin y Col., 1971).

Los principales cambios monitoreados en la bioquímica posmortem son aquellos que involucran a metabolitos participantes en la bioquímica energética del músculo, como glucógeno, creatina-fosfato, arginina-fosfato, ácido láctico, ATP y sus productos de degradación. Sin embargo, los productos de degradación endógena del ATP han recibido una mayor atención debido a que son la base para estimar el valor K y con él la frescura de los productos pesqueros.

El ATP en el Metabolismo Posmortem

En el músculo vivo el ATP es el nucleótido predominante. Se produce principalmente de la oxidación completa de la glucosa a CO_2 y H_2O , por medio del transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Cuando el organismo muere, la obtención de energía por la ruta aeróbica se imposibilita ya que cesa la circulación sanguínea (Sikorski, 1990). Por lo tanto, la principal fuente de abastecimiento de energía se pierde una vez que el organismo ha muerto. El metabolismo anaerobio lo sustituye, resultando en la conversión de glucógeno a ácido láctico u octopina (Figura 4). Este último metabolito se acumula en el músculo de una gran variedad de invertebrados, entre ellos el calamar (Wongso y Col., 1998; Hiltz y Col., 1974; Hiltz y Dyer, 1971).

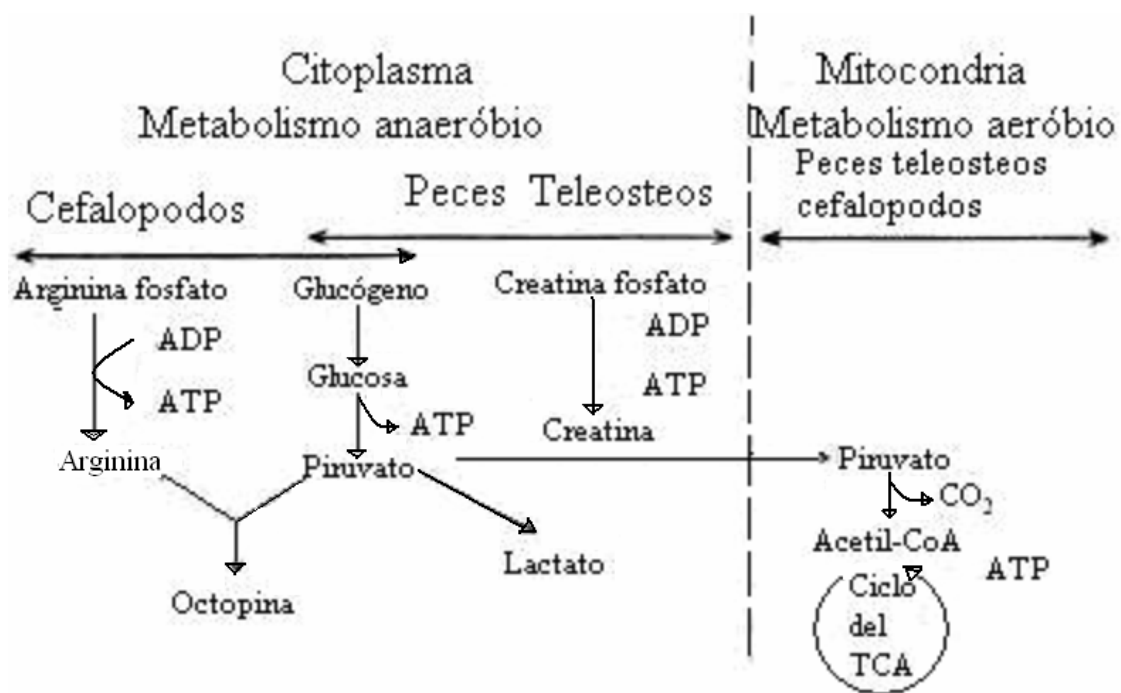


Figura 4. Degradación aeróbica y anaeróbica del glucógeno en el músculo de especies marinas.

Fuente: Huss, 1995.

La fuente principal e inmediata para la síntesis de ATP en el músculo posmortem es a través de la glucólisis anaerobia, a partir del glucógeno almacenado en el músculo esquelético. En la mayoría de los organismos, el producto final de esta vía es el ácido láctico. Sin embargo, en invertebrados como el calamar que carecen de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), el producto final es la octopina (Morán, 2002; Wongso et al., 1998; Hiltz et al., 1974; Hiltz y Dyer, 1971). Después de la muerte, la concentración de ATP permanece constante debido principalmente a la actividad de la creatina-quinasa o arginina-quinasa; esta última en la mayoría de los moluscos (Huss, 1995). En moluscos, el ADP formado como resultado de la actividad ATPasa es refosforilado a partir de la arginina-fosfato a ATP, produciéndose simultáneamente arginina. La concentración de ATP se mantiene constante hasta que la arginina-fosfato empieza a descender (Wang y Col., 1998; Watabe y Col., 1991; Iwamoto y Col., 1988).

En el Golfo de California, el método de captura para el calamar gigante es mediante el uso de poteras manuales, en donde se somete al organismo a un gran estrés resultado de las heridas causadas por la potera y a su forcejeo por liberarse. Esto trae como consecuencia una disminución en la concentración de glucógeno y de arginina-fosfato, resultando en una rápida degradación del ATP y sus productos relacionados. En organismos estresados la actividad de las enzimas responsables de la degradación de nucleótidos y nucleósidos es más elevada que en organismos no estresados, lo cual resulta en una más rápida degradación de estos metabolitos (Sigholt y Col., 1997).

Una vez que las fuentes productoras de ATP se han agotado, los nucleótidos de adenina se deaminan a IMP y eventualmente hacia productos finales como HxR e Hx, en donde el paso limitante en esta degradación varía con la especie. En algunos moluscos el paso limitante puede ser AMP, mientras que en otras especies es el IMP, determinando esto un patrón característico de degradación (Haard, 1995).

En una gran variedad de especies el patrón normal de degradación del ATP es mediante su defosforilación y deaminación para formar IMP, el

cual se acumula en el músculo dentro de las primeras 24 h, para posteriormente degradarse lentamente a HxR y Hx. Esta degradación presenta, en la mayoría de los casos, un comportamiento lineal con pendiente negativa respecto al tiempo (Hattula y Col., 1993; Price y Col., 1991; Greene y Col., 1990; Murata y Sakaguchi, 1986).

El patrón de degradación del ATP en especies marinas invertebradas no ha sido suficientemente estudiado. Varios autores han propuesto como ruta principal la conversión de AMP a HxR vía Ado (Figura 5), debido a que estudios en moluscos bivalvos mostraron una baja actividad de AMP deaminasa (Cheuk y col, 1979; Hiltz y col, 1974). Sin embargo, la acumulación de IMP en el músculo posmortem de moluscos también se ha reportado (Segedhal y Col., 1997). Estudios realizados por Morán (2002) en *Dosidicus gigas*, revelaron la presencia tanto de IMP como de Ado, de tal forma que no existe en invertebrados un patrón de degradación bien caracterizado.

El Índice K como Indicador para Evaluar Frescura

El índice o valor K propuesto por Saito y col. (1959), es un buen indicador para la determinación de la frescura para una gran variedad de especies marinas. Se basa en la cuantificación de ATP y sus productos de degradación hasta Hx y se calcula con la fórmula siguiente:

$$K (\%) = \frac{HxR + Hx}{ATP + ADP + AMP + IMP + Ado + HxR + Hx} \times 100$$

El índice K (IK) incrementa mucho más rápido en músculo posmortem de calamar que en el de pescado. En un estudio citado por Yamanaka y Col. (1987) se reportó para calamar (*Tadarodes pacificus*) un IK de 45% inmediatamente después de su captura. Para la especie, este valor es aceptable como calidad "sashimi", pero un pescado con un valor similar se le consideraría como "no fresco" e inapropiado para consumo como producto

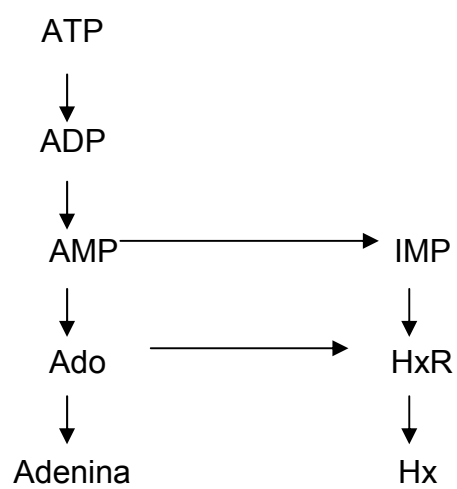


Figura 5. Principales rutas de degradación del ATP en la bioquímica posmortem de especies marinas

Fuente: Leray y col, 1979.

crudo (Nakamura y Col., 1985). Morán (2002) reportó para calamar gigante (*Dosidicus gigas*) del Golfo de California un IK cercano al 70% al primer día de almacenamiento en hielo, con lo cual concluyó que la aplicación tradicional del índice K no es adecuada para este organismo. Sus resultados mostraron una rápida degradación de los nucleótidos (ATP, ADP, AMP, IMP) para producir inmediatamente altos valores de HxR e Hx, los cuales son los responsables de altos valores iniciales de IK.

Enzimas Endógenas Participantes en la Degradación del ATP y sus Productos de Degradación

Las enzimas endógenas juegan un papel fundamental en la bioquímica posmortem. En el organismo vivo, las enzimas están reguladas a beneficio propio del animal; sin embargo, cuando este muere sus células ya no tiene control sobre la síntesis y regulación enzimática. Por lo tanto, el tejido queda a expensas de cambios bioquímicos endógenos propiciado por las enzimas musculares, lo que conlleva a la reducción de la frescura. Lo anterior ha llevado a investigadores del área de la bioquímica muscular posmortem a suponer que el control de la catálisis enzimática endógena podría controlar la reducción de la calidad y prolongar la vida de anaquel de los productos pesqueros (Haard, 1995). Estos eventos bioquímicos regulados por enzimas endógenas son dependientes de la temperatura, por lo que es importante enfriar los productos marinos inmediatamente después de su captura (Iwamoto y Col., 1988)

La continua actividad de ATPasas en el músculo posmortem contribuye a la reducción del ATP en el músculo. Este nucleótido es la fuente de energía fundamental para varios mecanismos y metabolitos incluidos dentro del proceso global de la contracción muscular, por ejemplo: 1) la miosina ATPasa, la cual libera energía para la contracción, 2) la actividad ATPasa del retículo sarcoplásmico, requerida para bombear Ca^{+2} durante la relajación, 3) la actividad ATPasa mitocondrial requerida para bombear iones Ca^{+2} y 4) la actividad ATPasa del sarcolema, requerida para bombear Na^{+} y K^{+} , generando un gradiente en la membrana plasmática. Al parecer la

miosina ATPasa es la principal responsable de la hidrólisis de ATP a ADP en la célula posmortem (Haard, 1995).

En la mayoría de las especies pesqueras, el ATP se transforma normalmente a IMP dentro de las primeras 24 horas posmortem de almacenamiento. Este último metabolito es uno de los principales responsables del comportamiento del IK en una gran variedad de especies. Este comportamiento supone una gran actividad de las enzimas encargadas de degradar ATP hasta IMP, así como una lenta actividad de la enzima 5'-nucleotidasa, responsable de su conversión a HxR (Figura 6). Esta última enzima es una de las más estudiadas dentro de la bioquímica posmortem de nucleótidos y nucleósidos, debido a que su actividad define en gran medida el IK para la mayoría de los vertebrados (Marseno y col., 1993a). En algunos moluscos, como el calamar, la velocidad de degradación de ATP hasta HxR e Hx es sorprendentemente rápida. Como se mencionó anteriormente, Morán (2002) obtuvo un IK de 70 % al primer día de almacenamiento en hielo para *Dosidicus gigas*, resultado de las altas concentraciones de Hx detectadas en su músculo dentro de las primeras 24 h posmortem. Lo anterior supone una intensa actividad catalítica de las enzimas participantes de la conversión de ATP a Hx.

Adenosina Monofosfato Deaminasa

La enzima AMP deaminasa (E.C. 3.5.4.6.) cataliza la deaminación irreversible de AMP a IMP y amoníaco (Norman y col., 2001). En 1928, Schmidt describió la presencia de esta enzima en músculo. En sus estudios separó AMP deaminasa de adenosina deaminasa, aislando al ácido inosínico y al amoníaco como productos de la reacción. Reportó también que esta enzima deamina específicamente a adenosina 5'-monofosfato (AMP). La AMP deaminasa es una enzima citosólica localizada en las miofibrillas del músculo esquelético, cardíaco, liso, hígado y riñón, así como en otros

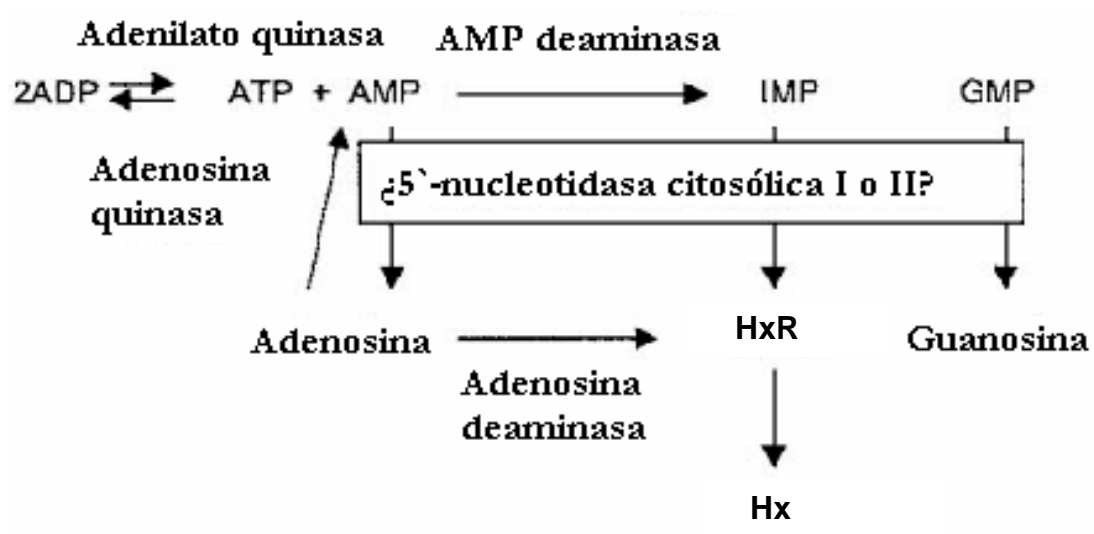


Figura 6. Figura 1. Principales enzimas responsables de la degradación de ATP hasta hipoxantina.

Fuente: Sala-Newby y col., 2000.

órganos y tejidos (Ya-Pin, 1957). La enzima tiene un importante papel bioquímico y fisiológico en el metabolismo energético, al competir con la enzima 5'-nucleotidasa por el AMP disponible (Mahnke-Zizelman y col., 1998).

La AMP deaminasa se encuentra en una gran variedad de eucariotes; sin embargo, en procariotes no se ha reportado. Estos últimos organismos en lugar de AMP deaminasa poseen AMP nucleosidasa, la cual hidroliza al AMP a adenina y ribosa 5-fosfato (Merkler y col., 1989).

Por años se pensó que el músculo de invertebrados (crustáceos y moluscos) carecía de AMP deaminasa; sin embargo, posteriormente la enzima se purificó en crustáceos de agua dulce y posteriormente en crustáceos marinos. Aunque la enzima está presente en la mayoría de los tejidos animales, su actividad parece ser menor en todos los organismos invertebrados. La AMP deaminasa varía en aspectos cualitativos y cuantitativos dependiendo de su origen. Se reportan además, concentraciones mayores en músculo esquelético en comparación con otros tejidos (Izem y col., 1993; Ogasawara y col., 1983).

Papel Fisiológico de la AMP Deaminasa

Durante intensa actividad, la velocidad de utilización de ATP en el músculo esquelético es más alta que su regeneración, lo cual conduce a una acumulación de ADP y AMP. Para evitar la acumulación de AMP dentro de la célula, éste es deaminado a IMP y amoníaco por medio de AMP deaminasa. La actividad de esta enzima en el músculo esquelético es alta por lo que la acumulación de IMP y amoníaco después de ejercicio intenso puede alcanzar concentraciones de hasta $10 \text{ mM (kg base seca)}^{-1}$ (Hellsten y col., 1999).

Debido a que la AMP deaminasa desplaza el equilibrio de la reacción catalizada por la mioquinasa ($2 \text{ ADP} \rightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$) hacia la resíntesis de ATP, un papel propuesto para la enzima es regular la relación ATP/ADP (Norman y col., 1998). La estabilización de la carga energética adenilada

[CEA; $CEA = (ATP + \frac{1}{2} ADP)/(ATP+ADP+AMP)$] es una de las principales funciones fisiológicas propuestas para AMP deaminasa. Izem y col. (1993) mostraron que la CEA afecta la actividad de AMP deaminasa. La actividad de dicha enzima purificada de músculo de elasmobranquios se mantuvo sin cambio cuando los valores de CEA oscilaron entre 0 y 0.4, pero a valores más altos su actividad fue 0. Lo anterior significa que la actividad de AMP deaminasa en un organismo vivo en reposo es despreciable (Lushchak y col., 1998). Bajo condiciones de reposo la CEA en el músculo de peces oscila entre 1.0 y 0.8 (Mathews y Van Holde, 1998)

La acción de AMP deaminasa es la principal fuente de producción de amoniaco en el músculo esquelético de vertebrados, en particular, en el músculo de peces (Lushchak y col., 1998). Cheuk y col. (1979) encontraron que la producción de amoniaco en tejido de camarón durante la etapa inicial posmortem, se explica en más de un 50 % por la actividad de la AMP deaminasa y la adenosina deaminasa, contribuyendo con ello a un aumento significativo de bases volátiles totales en el músculo de camarón.

Otra función descrita para AMP deaminasa es su papel en el ciclo de los nucleótidos de purina. Cuando el IMP se forma como una consecuencia de la deaminación de AMP, se puede combinar con aspartato derivando subsecuentemente en la formación de fumarato y AMP. La producción de fumarato, vía ciclo de los nucleótidos de purina es el único camino metabólico conocido para expandir la reserva de intermediarios del ciclo del ácido cítrico durante la contracción muscular (Lushchak y col., 1998; Hisatome y col., 1998; Merkler y col., 1989). La regulación de esta reserva por la degradación de AMP ocurre tanto en eucariotes como en procariotes. En procariotes, esta regulación está controlada por la acción de la AMP nucleosidasa ($AMP + H_2O \rightarrow Adenina + ribosa\ 5-fosfato$), mientras que para eucariotes, la enzima reguladora es la AMP deaminasa (Merkler y col., 1989).

Regulación de AMP Deaminasa

Mucho se ha estudiado sobre la activación e inhibición del complejo tetramérico AMP deaminasa (casi siempre un tetrámero en músculo esquelético de vertebrados), con la finalidad de entender como actúa y como se regula esta enzima. Hasta el momento ha sido difícil establecer con precisión el mecanismo de regulación de esta enzima en el organismo vivo, debido a que existen un gran número de posibles formas de regulación, dependiendo de las condiciones fisiológicas y de la especie de organismo (Sabina y Mahnke-Zizelman, 2000)

Debido a que uno de los papeles fisiológicos de esta enzima es mantener un balance de la CEA, la enzima es regulada por la concentración de AMP, ADP y ATP dentro de la célula; sin embargo, estos metabolitos no son los únicos participantes en su regulación. En un estudio realizado por Raffin y Leray (1979) con pez perro (*Scyliorhinus sp*) determinaron que la enzima posee mayor actividad a valores menores de CEA, actuando de esta manera para restablecer el balance energético dentro de la célula al disminuir la concentración de AMP, aumentando así el valor de CEA.

Como se mencionó anteriormente, AMP deaminasa es una enzima metabólica estrechamente vinculada al ciclo de los compuestos púricos y al metabolismo energético de la célula. La enzima puede estar regulada por nucleótidos análogos a AMP (GTP, ATP y ADP principalmente), así como por las concentraciones intracelulares de iones K^+ y Na^+ y PO_4^{3-} . El efecto activador o inhibitorio de estos compuestos esta en función de la fuente de la enzima. En un estudio reciente realizado por Swieca y col. (2004) en músculo liso de gallina, encontraron que AMP deaminasa se activó con la presencia de ATP (1 mM) y ADP (1mM), disminuyendo significativamente su valor de K_m . De igual forma, analizaron el efecto del PO_4^{3-} , el cual no mostró un comportamiento uniforme y su efecto dependió de la concentración usada. A una concentración de 0.5 mM activó ligeramente a la enzima, mientras que a 2.5 mM se manifestó un efecto inhibitorio. Merkler y col. (1989) trabajando con AMP deaminasa de levadura, observaron que la

enzima se inhibe con GTP en la presencia y ausencia de ATP como activador, concluyendo que GTP es un inhibidor competitivo de AMP. La activación por ATP causa un incremento en la afinidad de la enzima por AMP, pero también incrementa su afinidad por GTP ya que las constantes de inhibición para GTP decrecen cuando ATP se encuentra cercano a la saturación. GTP parece unirse a sitios separados de ATP.

Algunas enzimas son reguladas por el equilibrio entre sustratos y productos. Merkler y col. (1989) estudiaron la inhibición por productos del AMP deaminasa de levadura, observando que la liberación de IMP y NH_3 del complejo E-IMP- NH_3 es un proceso al azar. Por otra parte, al analizar el efecto inhibitorio tanto de IMP como de NH_3 , se detectaron K_i de 4700 y 3000 respectivamente, lo cual indica un bajo poder inhibitorio de ambos productos de la reacción.

Una gran variedad de enzimas requiere de cationes mono o divalentes como activadores. Para el caso de las AMP deaminasas el catión más frecuentemente utilizado y que mejores resultados ha mostrado es el K^+ , seguido del Na^+ . Smiley y col. (1967) analizaron el efecto de cationes mono y divalentes sobre las velocidades iniciales de la enzima, encontrando que la AMP deaminasa se activó por cationes monovalentes en donde el K^+ y el Na^+ fueron igualmente eficientes, mientras que Li^+ , NH_4^+ y Rb^+ , mostraron 75, 60 y 50 % de activación respectivamente.

Peso Molecular y Estructura de la AMP Deaminasa

La secuencia del gen de AMP deaminasa del músculo esquelético de humanos y rata, indica que la enzima esta compuesta de subunidades de 85 kDa. Estos resultados aunados a la bien documentada naturaleza tetramérica de la AMP deaminasa del músculo esquelético, se deduce que la enzima posee un peso molecular de 340 kDa. Sin embargo, los datos en la literatura indican que la masa molecular de la enzima de varias especies se sitúa en el rango de 238 a 326 kDa. La enzima esta compuesta de 4 subunidades idénticas o muy similares de 60 kDa (rata) o 69 kDa (pollo y

conejo) (Ranieri-Raggi y col., 1997; Mahnke-Zizelman, 1998). Se han purificado y caracterizado múltiples isoformas de AMP deaminasas de células de tejidos de ratas y humanos provenientes de una familia multigene AMPD. La secuencia de aminoácidos en dichos genes (humanos) revela divergencias en la parte N-terminal y dominios muy conservados en el extremo C-terminal (Mahnke-Zizelman, 1998). Estudios realizados sobre AMP deaminasa de músculo esquelético de conejo, revelaron que la enzima es un heterodímero y no un homodímero como se había pensado, basándose en el peso molecular de cada una de las subunidades mediante análisis de SDS-PAGE (Ranieri-Raggi y col., 1997; Mahnke-Zizelman, 1998).

Stankiewicz y Spychala (1981) no encontraron diferencias considerables en la composición de aminoácidos de AMP deaminasa de rata, conejo, gallina, rana y perca. La razón de residuos polares y no polares fue similar en cada una de las AMP deaminasas estudiadas, variando entre 1.5 y 1.21.

5'-nucleotidasa

La enzima 5'-nucleotidasa (E.C. 3.1.3.5) fue inicialmente descrita en corazón y músculo esquelético de conejo en 1934 por Reis (Zimmermann, 1992). Esta enzima cataliza la ruptura hidrolítica de 5'-ribo-nucleótidos y 5'-deoxyribonucleótidos a nucleósidos y fosfatos. Se han descrito diferentes tipos de 5'-nucleotidasas, pero han llamado poco la atención en comparación con las quinasas, las cuales son enzimas que catalizan la reacción reversa, es decir, la fosforilación de nucleósidos (Fini y col., 2003; Rampazo y col., 1999).

Itoh y Kimura (2002), al igual que Tomioka y Endo (1984), confirmaron que la actividad de la enzima 5'-nucleotidasa se correlaciona bastante bien con un aumento en el IK, por lo que varios trabajos se han encaminado a purificarla y caracterizarla como un paso preliminar para entender su papel durante la autólisis posmortem de ATP (Itoh y Kimura, 2002; Marseno y col., 1993b).

La enzima 5'-nucleotidasa esta ampliamente distribuida en tejidos de vertebrados e invertebrados, así como también en bacterias y plantas (Skladanowski y col., 1996). Se han identificado varias isoformas de esta enzima en diferentes organismos, resaltando aquellas de fuentes bacterianas por el hecho de que las nucleotidasas de estos organismos hidrolizan todos los ribo y deoxinucleotidos, uridina difosfato y sustratos sintéticos (McMillen y col., 2003).

Solo en las células humanas, existen cinco clases de 5'-nucleotidasas, a saber: ecto-5'-nucleotidasa eN, 5'-nucleotidasa IA-cN-IA citosólica, 5'-nucleotidasa II-cN-II citosólica, 5'-nucleotidasa III-cN-III citosólica y 5'(3)-deoxinucleotidasa-cdN citosólica. Ellas difieren en la localización celular y especificidad por el sustrato. Las mejores caracterizadas son las ecto-nucleotidasas, unidas a la membrana plasmática por glucosil fosfatidil inositol; esta, aunque tiene una amplia afinidad por otros 5'-ribofosfatos, se considera que el AMP es su principal sustrato. La 5'-nucleotidasa IA-cN-IA citosólica, llamada también 5'-nucleotidasa específica para AMP por su alta especificidad por este nucleótido, es altamente expresada en músculo esquelético y en el corazón (Zimmermann, 1992).

Papel Fisiológico de la 5'-nucleotidasa

Las nucleotidasas pueden tener un papel similar a la AMP deaminasa al controlar la concentración de AMP. La AMP deaminasa compite por el sustrato con 5'-nucleotidasa para producir IMP. Este puede ser almacenado para la restauración de la reserva de nucleótidos de adenina cuando el oxígeno regrese a su estado normal o cuando la velocidad de síntesis de ATP sea mayor a la velocidad de degradación. Este IMP puede degradarse por la 5'-nucleotidasa cN-II para producir HxR. Así, el pool de AMP se remueve de la célula como adenosina (Ado) o HxR, o retenido como IMP (Skladanowski y col., 1996).

La acción de la enzima sobre AMP produce Ado, el cual juega un papel importante en el flujo sanguíneo del corazón. Esta se libera de las

células sanguíneas del corazón durante el ejercicio y la hipoxia y actúa como un vasodilatador (Yamazaki y col., 1991).

El papel de las nucleotidasas citoplásmicas está relacionado con la degradación intracelular de ATP vía AMP a adenosina o vía IMP a inosina. Estas enzimas son de particular importancia en situaciones donde la CEA ha disminuido como resultado de un incremento de carga de trabajo o anoxia. La concentración de AMP dentro de la célula necesita estar bajo control para prevenir la libre interconversión de AMP, ADP y ATP por la acción de la adenilato kinasa (E.C. 2.7.4.3.), resultado de una excesiva activación de movilización de glucógeno y glucólisis. Ya que los productos Ado e HxR pueden dejar la célula, la serie de procesos fisiológicos derivados por su liberación es idéntica a aquellos ocasionados por la Ado formada extracelularmente (Zimmermann, 1992).

Regulación de la 5'-nucleotidasa

La concentración molar de los sustratos en la célula regula el balance entre anabolismo y catabolismo de deoxiribonucleótidos, manteniendo un buen pool de Dntp (Deoxinucleótidos trifosfatos; Rampazo y col., 1999). Esto sugiere que la 5'-nucleotidasa juega un papel importante en la regulación de ribo y deoxiribonucleósidos monofosfatos (Echetebe, 1980). Los nucleósidos, pero no los nucleótidos, pasan libremente a través de la membrana por lo que la dirección del flujo es determinado por su gradiente de concentración (Gazziola y col., 2001).

La acción enzimática de la 5'-nucleotidasa está involucrada en la regulación del IMP intracelular, el cual es el precursor de todos los nucleótidos púricos. Éste no solo es un bloque estructural de los ácidos nucleicos, sino además es un transductor de energía, una molécula señal intra y extracelular y un regulador metabólico. La regulación de su hidrólisis es de suma importancia para un gran número de células (Allegrini y col., 2001)

La actividad enzimática de la 5'-nucleotidasa es regulada por varios efectores incluyendo el sustrato, ATP y fosfatos inorgánicos. Ambos, el ATP y los fosfatos, regulan su actividad de una manera compleja, donde el grado de activación por ATP depende fuertemente de la concentración de fósforo inorgánico. El mecanismo por el cual estos efectores regulan su actividad enzimática aún no ha sido elucidado (Spychala y col., 1999).

Peso Molecular y Estructura de la 5'-nucleotidasa

El peso molecular y estructura de esta enzima esta en función del organismo y del tejido en estudio. En pescado roca (*Sebastes sp*) la nucleotidasa unida a membrana posee un peso molecular de 265 kDa; es un homotetrámero con cuatro subunidades idénticas de 67 kDa, muy similar a la 5'-nucleotidasa de abadejo (*Gadus sp*). Por otro lado, la 5'-nucleotidasa citosólica del mismo pez roca pose un peso molecular de 242 kDa, formando un heterodímero de 148 y 94 kDa, muy parecida en peso moléculas a la carpa (*Ctenopharyngodon sp*) con 240 kDa, pero conformada por ocho subunidades. Un heterodímero similar ha sido reportado en hígado de bovino con subunidades de 65 y 57 kDa (Zekri y col., 1988), mientras que en hígado y corazón de rata se reporta en forma de dímeros de 74 kDa (Marseno y col., 1993a).

Tanto las nucleotidasas unidas a membrana como las citosólicas comparten su característica estructural de ser glucosiladas, por lo que pueden ser purificadas mediante cromatografía de afinidad con concanavalina A, la cual tiene afinidad por monosacaridos como la manosa. Mediante análisis de cDNA se dedujo la estructura primaria de la 5'-nucleotidasa, revelando cuatro o cinco sitios de glucosilación. El tratamiento diferencial con endoglucosidasa H y F ha diferenciado la naturaleza de las cadenas de glucanos. En la 5'-nucleotidasa de hígado de rata, todas las cadenas de glucanos están compuestas de complejos de alta manosa (Zimmermann, 1992).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Las enzimas AMP deaminasa y 5'-nucleotidasa se encuentran presentes en el músculo de calamar Gigante *Dosidicus gigas* y poseen una alta actividad enzimática.

Objetivo General

Caracterizar las enzimas AMP deaminasa y 5'-nucleotidasa del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) del Golfo de California.

Objetivos Específicos

1. Cuantificación del ATP y sus productos de degradación dentro de las primeras 24 h posmortem.
2. Extracción y purificación de AMP deaminasa y 5'-nucleotidasa
3. Determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura, así como la estabilidad a los mismos parámetros.
4. Evaluar el efecto de ATP y ADP como efectores, así como el de sales mono y divalentes.
5. Determinar los parámetros cinéticos de ambas enzimas (K_m , V_{max} , K_{kat})

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Muestra

Los ejemplares de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) fueron capturados por medio de poteras en el Golfo de California en el mes de febrero de 2005. El calamar fue eviscerado cuidadosamente y lavado con agua destilada. El manto se colocó en bolsas de polietileno y se enhielo en una hilera en capas alternadas de hielo-manto para ser trasladado al Laboratorio de Productos Pesqueros de CIAD (Hermosillo, Sonora, México). Una vez en el laboratorio, los mantos colocados de nuevo en bolsas de polietileno se congelaron a $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se almacenaron hasta su utilización.

Muestra para la Cuantificación de Nucleótidos y Nucleósidos

Para la cuantificación de nucleótidos y nucleósidos se trabajó con una muestra de 6 ejemplares ($n = 6$), obteniéndose la muestra de la parte baja del manto (porción cercana a la cabeza). Para el tiempo cero posmortem se cortó una porción de 10 g de manto a un calamar recién capturado (a bordo de la embarcación) y se congeló criogénicamente en nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para el tiempo 1 h posmortem, se congeló criogénicamente una porción de 10 g de manto de un calamar el cual había permanecido enhielado (0°C) por una hora. El procedimiento fue similar para la recolección de muestras después de 2, 3, 5, 8, 12, 18 y 24 h posmortem.

Cuantificación de Nucleótidos y Nucleósidos

La determinación de la concentración de nucleótidos y nucleósidos se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se siguió la metodología descrita por Ryder (1985). Se homogeneizaron 5 g de músculo con 25 mL de ácido perclórico 0.6 M a 0°C en un homogeneizador osterizer (Osterizer Company, México) durante 1 min. El homogeneizado se centrifugó a $3000\text{ }xg/10\text{ min/ }0^{\circ}\text{C}$. El sobrenadante se

neutralizó a pH 6.5–6.8 con KOH 1 M y se dejó reposar por 30 min a 0° C, para posteriormente remover el perclorato de potasio formado por filtración con papel Whatman No. 1. El sobrenadante se diluyó a 20 mL con agua destilada y se almacenó a –20 °C hasta su utilización.

Para la determinación por HPLC se inyectaron 20 µL del sobrenadante diluido en un cromatógrafo Hewlett Packard Modelo GmbH (Waldbronn, Germany) utilizando una columna Beckman de fase reversa C18 ultrasphere ODS de 5 µM y 4.6 mm de diámetro interno por 250 mm de largo (Waldbronn, Germany). La fase móvil consistió de un amortiguador de fosfatos compuesto de 0.04 M de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) y 0.06 M de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄), con flujo de 1 mL/min. Los nucleótidos y nucleósidos se detectaron a 254 nm con un detector UV Hewlett Packard 1100 GmbH (Waldbronn, Germany). El equipo se calibró diariamente inyectando 20 µL de una solución 0.166 mM de cada compuesto de referencia.

Purificación de AMP Deaminasa

Determinación de Actividad

La actividad AMP deaminasa se determinó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) monitoreando la aparición de IMP a 249 nm. La mezcla de reacción se compuso de 100 µL de extracto enzimático (el cual puede ser el extracto crudo o el pool resultante de cromatografía) más 1000 µL de AMP 20 mM en buffer cacodilato pH 6.0, KCl 0.18 M y DTT 0.1 mM. El ensayo enzimático se desarrolló a 35 °C por 15 min, para posteriormente detener la reacción sumergiendo la mezcla de reacción en agua a ebullición por 2 min (Cuadro 1). La mezcla de reacción se centrifugó a 15 000 *xg*/4 °C/5 min. El sobrenadante se filtró en filtro de 0.22 µm y se inyectaron 20 µL al equipo de HPLC. Se utilizó una velocidad de flujo de 1.2 mL/min y una temperatura de columna de 50 °C. El amortiguador de elusión, así como las características de la columna y del

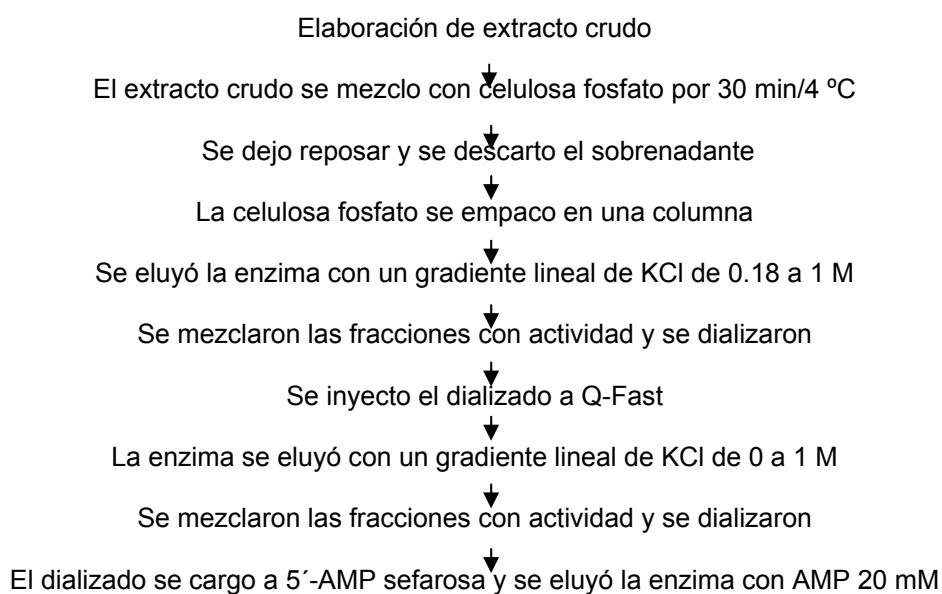
equipo fueron los mismos a los utilizados en la cuantificación de nucleótidos y nucleósidos. La unidad enzimática fue definida como los μmoles de IMP formados min/mL .

Cuadro 1. Ensayo de actividad de la AMP deaminasa

	Actividad	Control
Extracto enzimático	100 μL	-----
Sustrato ¹	1000 μL	1000 μL
Incubar 15 min a 35 °C		
Extracto enzimático		100 μL
2 min en agua a ebullición		
Centrifugar a 15 000 $xg/5$ min		
Filtrar		
Cuantificación de IMP en HPLC		

AMP 20 mM en el buffer correspondiente.

Diagrama de Flujo de Purificación



Preparación del Extracto Crudo

El extracto crudo se preparó homogeneizando 100 g de manto de calamar con 8 volúmenes del buffer de extracción a pH 6.5, compuesto de KH_2PO_4 0.054 M, K_2HPO_4 0.035 M, KCl 0.18 M y DTT 0.1 mM (amortiguador A) Este homogeneizado se agitó por una hora en una placa de agitación a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 48 000 $\times g$ /20 min/4 °C. El sobrenadante fue el extracto crudo.

Cromatografía en Celulosa Fosfato

Para la cromatografía en celulosa fosfato (sigma-aldrich, México) ésta se lavo con KOH 0.5 N, H_2O , HCl 0.5 N, H_2O y finalmente con EDTA 5×10^{-3} N; posteriormente se equilibró con amortiguador A. Al extracto crudo se le añadieron 3 g de celulosa fosfato; esta suspensión se agito lentamente por 30 min, y se dejó reposar por 30 min a 4 °C y se descarto el sobrenadante. La celulosa fosfato se empaco en una columna y se lavo con amortiguador A, a una velocidad de flujo de 30 mL/h. El monitoreo de proteína se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada por Bradford (1976). Posteriormente la elusión se realizó con 5 volúmenes de cama a una velocidad de 30 mL/h utilizando un gradiente de KCl de 0.18 a 1.0 M en amortiguador A, colectando fracciones de 4 mL. La actividad AMP deaminasa se determino de acuerdo a la técnica especificada en el Cuadro 1 (Rush y col., 1998).

Cromatografía en Q-Fast

La resina Q-Sefarosa-Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) se empaco en una columna y se equilibrio con amortiguador B (TRIS-HCl 40 mM pH 7.8). Las fracciones que mostraron actividad enzimática como resultado de la cromatografía en celulosa fosfato se combinaron y se dializaron 2 veces en 2 L de amortiguador B con un tiempo de recambio de amortiguador de 5 h. La muestra dializada se aplico a una velocidad de flujo de 10 mL/h a 4 °C. Después de la aplicación de la

muestra, la columna se lavo con amortiguador B hasta que la absorbancia a 280 nm en las fracciones eluidas se mantuvo constante. La elusión de las proteínas adheridas a la resina se llevo a cabo mediante un gradiente lineal de KCl de 0-1.0 M en el mismo amortiguador B. La velocidad de elusión fue de 10 mL/h y se colectaron fracciones de 2 mL. El monitoreo de proteína se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada por Bradford (1976). La actividad AMP deaminasa se determino de acuerdo a la técnica especificada en el Cuadro 1 (Rush y col., 1998).

Cromatografía en 5'-AMP Sefarosa

La resina 5'-AMP sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) se lavó con 200 mL de agua destilada y después con 200 mL de TRIS-HCl 10 mM pH 7.3 y NaCl 0.15 M (amortiguador C). Las fracciones activas de la cromatografía en Q-Fast Flow fueron dializadas 2 veces por cinco horas contra 30 volúmenes de amortiguador C; posteriormente se aplicaron a la columna a una velocidad de flujo de 5 mL/h a 4 °C. Posteriormente la resina se lavó con 3 volúmenes de amortiguador C hasta que la lectura de absorbancia a 280 nm se mantuvo constante. La elusión se realizo con AMP 20 mM en amortiguador C, con un flujo de 10 mL/h. El monitoreo de proteína se realizó mediante la técnica de Bradford (1976). La actividad AMP deaminasa se determinó de acuerdo al protocolo descrito en el Cuadro 1 (Rush y col., 1998). Las fracciones activas se mezclaron y se congelaron a -86 °C.

Purificación de 5'-nucleotidasa

Determinación Actividad

La actividad de 5'-nucleotidasa se monitoreó mediante la cuantificación de fósforo inorgánico de acuerdo a la metodología descrita por Fiske y Subbarow (1925). Se tomaron 40 µL de extracto enzimático (el cual puede ser el extracto crudo o el pool resultante de cromatografía), se agregaron 360 µL de AMP 10 mM en buffer citrato de sodio 40 mM, DTT

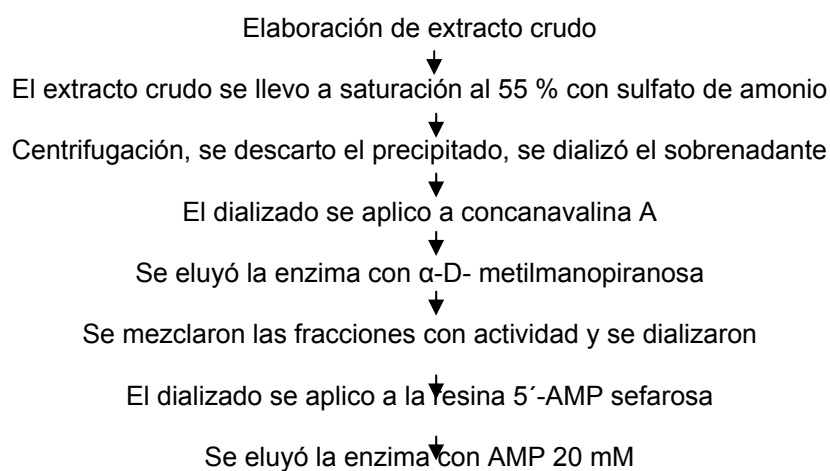
0.1mM, NaCl 110 mM, MgCl₂ 20 mM, y CaCl₂ 20 mM. La mezcla de reacción se incubó por 10 min a 50 °C (Cuadro 2). La reacción se detuvo con molibdato de amonio en HCl 0.5 N y ácido ascórbico al 10 %. La mezcla se incubó por 40 min a 40 °C para promover la formación de un color azul, el cual se leyó a 820 nm en un espectrofotómetro Kary 50 (Bio-rad). La unidad enzimática fue definida como los μ moles de Pi formados por min/mL.

Cuadro 2. Ensayo de actividad para la 5'-nucleotidasa

	Actividad	Control
Extracto enzimático	40 μ L	-----
Sustrato ¹	360 μ L	360 μ L
Incubar 10 min a 35 °C		
Extracto enzimático		40 μ L
Mezcla desarrolladora de color	850 μ L	850 μ L
Incubar 40 min a 40 °C		
Centrifugar a 15 000 xg/5 min		
Leer absorbancia a 820nm		

AMP 10 mM en el buffer correspondiente.

Diagrama de Flujo de Purificación



Preparación del Extracto Crudo

El extracto crudo se preparó homogeneizando una muestra de 50 g de manto de calamar con 4 volúmenes de citrato de sodio 40 mM (pH 4.5) conteniendo $MgCl_2$ 20 mM, y NaCl 25 mM (amortiguador D) y 0.1 mM de PMSF de acuerdo a la metodología de Marseno y col. (1993b). El homogeneizado se centrifugó a 48 000 xg / 2 h /4 °C. El sobrenadante fue el extracto crudo.

Precipitación con Sulfato de Amonio

Se determinó el volumen del extracto crudo y se sometió a precipitación con sulfato de amonio en el rango de 0-55 % de saturación. Una vez disuelto el sulfato de amonio, la mezcla se centrifugó a 3 000 xg /20 min. Se descartó el precipitado y el sobrenadante fue dializado en amortiguador citrato de sodio 40 mM (pH 4.5) $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 110 mM, $CaCl_2$ 1 mM (amortiguador E) y PMSF 0.1 mM, utilizando una membrana de celulosa de 2.7 cm de diámetro y 30 cm de largo, la cual retuvo pesos moleculares $\geq 12\ 000$ kDa. La diálisis se realizó 2 veces contra 20 volúmenes de amortiguador E con un periodo de 5 h por cada cambio (Swieca y col., 2004; Smiley y col., 1967).

Cromatografía en Concanavalina A

Para la cromatografía en concanavalina A primeramente ésta fue lavada con 3 volúmenes de citrato de sodio 40 mM (pH 4.5) conteniendo NaCl 0.5 M, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM y 0.02 % de NaN_3 (amortiguador TBS- NaN_3) y después con 3 volúmenes de amortiguador E, el cual contenía 0.1 % de triton X-100 (amortiguador F) a una velocidad de flujo de 10 mL/h. El dializado se cargó a la columna a una velocidad de flujo de 10 mL/h. Posteriormente se aplicaron 3 volúmenes de amortiguador F con un flujo de 20 mL/h hasta que la absorbancia a 280 nm se mantuvo constante. La enzima se eluyó con 60 mL de metil α -D-manopiranoside en amortiguador F

con un flujo de 10 mL/h, colectándose fracciones de 2 mL. El monitoreo de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford (1976). La actividad 5'-nucleotidasa se determinó de acuerdo a la técnica especificada en el Cuadro 2 (Marseno y col., 1993).

Cromatografía en 5'-AMP Sefarosa

La resina 5'-AMP sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) se lavó previamente con 200 mL de agua destilada y posteriormente con 30 mL de amortiguador TBS- NaN_3 y equilibrada con 30 mL de buffer G (TRIS-HCl 40 mM, pH 7.4 y NaCl 0.15 M). Las fracciones activas de la cromatografía en concanavalina A se mezclaron y se sometieron 2 veces a diálisis contra 30 volúmenes de amortiguador G con un intervalo de recambio de amortiguador de 5 h. La fracción dializada se aplicó a la columna a una velocidad de 5 mL/h. Después de la aplicación de la muestra, la columna se lavó con 60 mL buffer G hasta que la lectura de absorbancia a 280 nm se mantuvo constante. La enzima se eluyó con AMP 20 mM en amortiguador G, utilizando un flujo de 5 mL/h. El monitoreo de proteína se realizó por la medio de la técnica descrita por Bradford (1976). La actividad 5'-nucleotidasa se determino de acuerdo al protocolo descrito en el Cuadro 2. Las fracciones activas se mezclaran y dializaron contra 2 cambios de amortiguador G en proporción 30/1 (amortiguador/muestra) con un tiempo de recambio de amortiguador de 5 h (Marseno y col., 1993a).

Análisis de Pureza

Electroforesis

SDS-PAGE y PAGE nativo. La electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizó para dar seguimiento al proceso de purificación de las enzimas, mediante la determinación de los patrones de bandas proteicas en las distintas fracciones obtenidas en las separaciones cromatográficas. Para SDS-PAGE se siguió el procedimiento descrito por Laemmli (1970), en geles de poliacrilamida al 14 % para ambas enzimas. La tinción de las bandas de

proteína se llevo a cabo por medio de la técnica del nitrato de plata (Whitaker, 1994; Copeland, 1994). El mismo procedimiento se realizo para la electroforesis nativa, pero con geles nativos de poliacrilamida al 8 %.

Cuantificación de Proteína

Absorbancia a 280 nm. Esta evaluación se utilizó para monitorear el contenido de proteína en las fracciones que se obtuvieron en las corridas cromatográficas de purificación de las enzimas. Se determinó la absorbancia a 280 nm directamente en alícuotas de 2 mL de la fracción analizada (Copeland, 1994).

Método de Bradford. Este método se utilizó en la cuantificación de proteína en las fracciones con actividad enzimática y para definir la cantidad de muestra a cargar en los geles de electroforesis. Para la implementación del método se mezclan 100 μ L de muestra con 1 mL del reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250 en ácido fosfórico); la mezcla se deja reposar 5 min para leer la absorbancia a 595 nm. La concentración de proteína se calculó utilizando una curva estándar previamente elaborada, utilizando albúmina de suero bovino (1 mg/mL) como estándar (Bradford, 1976).

Caracterización Bioquímica

Peso Molecular (PM)

El PM nativo de ambas enzimas se estimó por filtración en gel utilizando una columna empacada superdex 200 HR 10/30 con un diámetro interno de 10 mm, la altura de la cama empacada fue de 30 cm con un volumen total de cama de 24 mL. (Amersham biosciences, Piscataway, N.J.). Los estándares utilizados fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina equina (440 kDa), catalasa bovina (232 kDa), lactato deshidrogenada bovina (140 kDa) y albumina de suero bovino (66 kDa) (Amersham biosciences, Piscataway, N.J.). Para el caso de la AMP deaminasa, la resina se prelavó con amortiguador TRIS-HCl 40 mM pH 7.0. Para la 5'-nucleotidasa, la columna

se prelavó con amortiguador G. La muestra y las proteínas del estándar (200 μL) se aplicaron con un flujo de 5 mL/h, colectándose fracciones de 0.5 mL (Marseno y col., 1993a).

Punto Isoeléctrico (pI)

Se determinó el pI de las enzimas purificadas por medio de isoelectroenfoque analítico en geles de capa fina de acrilamida (LKB-Ampholine PAG-Plate) (Sigma-aldrich, México), conteniendo anfólitos para el rango de pH de 3.5 a 9.5. Se utilizó un kit de calibración de isoelectroenfoque compuesto con proteínas de pI conocido (Sigma-aldrich, México). Las bandas de proteínas fueron teñidas con nitrato de plata (Westermeier y col., 1997).

Efecto del pH

pH óptimo de actividad. El pH óptimo de actividad para AMP deaminasa se evaluó en el rango de pH de 5.0 a 8.5, utilizando como amortiguadores cacodilato de sodio (5.0 - 6.5) y TRIS-HCl (7.0 - 8.5), ambos a una concentración de 40 mM. El ensayo de actividad se muestra en el Cuadro 1.

El pH óptimo de acción para la enzima 5'-nucleotidasa se evaluó en el rango de 3.0 a 7.5, utilizando como amortiguadores citrato de sodio (3.0 - 6.5) y TRIS-HCl (7.0 - 7.5), ambos a una concentración molar de 40 mM. El ensayo de actividad se muestra en el Cuadro 2.

Estabilidad al pH. La estabilidad al pH para la enzima AMP deaminasa se determinó incubando la enzima en amortiguadores de distintos pH en el rango de 5.0 - 8.5. Se utilizaron como amortiguadores cacodilato de sodio (5.0 - 6.5) y TRIS-HCl (7.0 - 8.5), ambos a una concentración de 40 mM. El periodo de incubación fue de 60 min, tomando alícuotas cada 15 minutos para realizar ensayos de actividad tal y como se describe en el Cuadro 1.

La estabilidad al pH para la enzima 5'-nucleotidasa se determinó incubando la enzima en amortiguadores de distintos pH en el rango de 3.0 -

7.5. Se utilizaron como amortiguadores citrato de sodio (3.0 - 6.5) y TRIS-HCl (7.0 - 7.5), ambos a una concentración molar de 40 mM El periodo de incubación fue de 60 min, tomando alícuotas cada 15 minutos para realizar ensayos de actividad tal y como se describe en el Cuadro 2.

Efecto de la Temperatura

Temperatura óptima de actividad. La temperatura óptima de actividad para la enzima AMP deaminasa se determinó midiendo su actividad (Cuadro 1) en el rango de temperaturas de 0 a 60 °C.

La temperatura óptima de actividad para la enzima 5'-nucleotidasa se evaluó midiendo su actividad (Cuadro 2) en el rango de temperaturas de 0 a 70 °C.

Estabilidad térmica. La termoestabilidad de AMP deaminasa se determinó incubando la enzima por 60 min a diferentes temperaturas en el rango de 30 a 60 °C. Se tomaron alícuotas cada 15 min y se evaluó su actividad tal y como se muestra en el Cuadro 1.

La termoestabilidad de la enzima 5'-nucleotidasa se determinó incubando la enzima por 60 min a diferentes temperaturas en el rango de 10 a 60 °C. Se tomaron alícuotas cada 15 min y se evaluó su actividad tal y como se muestra en el Cuadro 2.

Características Cinéticas de las Enzimas

Determinación de K_m , V_{max} y K_{cat} . Se determinaron las constantes K_m , velocidad máxima (V_{max}) y constante de catálisis (K_{cat}). Estas se obtuvieron midiendo la velocidad inicial de reacción de cada enzima bajo condiciones controladas de temperatura, pH y fuerza iónica. Las concentraciones de sustrato establecidas para este ensayo fueron de 0.1 a 30 mM para ambas enzimas. La K_m y V_{max} para cada enzima se calculó posteriormente mediante un análisis de regresión de las gráficas de velocidad contra concentración de sustrato (gráfica de Michaelis y Menten). El número de recambio o constante de catálisis K_{cat} se obtuvo mediante la división de la V_{max} entre la

concentración molar de la enzima respectiva en el medio de reacción. Las concentraciones molares de cada enzima se estimaron usando sus pesos moleculares determinados por filtración en gel (Copeland, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de ATP y sus Productos de Degradación

La degradación del ATP y sus productos en el curso de las primeras 24 horas posmortem se muestran en la Figura 7. La concentración molar de ATP y ADP al tiempo cero (muestras congeladas criogénicamente inmediatamente después de la captura) fue de 6.54 $\mu\text{mol/g}$ y 0.49 $\mu\text{mol/g}$ de manto respectivamente, mientras que para el resto de los metabolitos fue menor a 0.1 $\mu\text{mol/g}$. Al momento de la captura el pool de compuestos adenilados se encuentra en su mayoría en forma de ATP, como era de esperarse, y el ADP presente se puede atribuir a la defosforilación del ATP como mecanismo principal en la obtención de energía para poder así realizar trabajo físico y forcejear durante la captura. Por otra parte la cuantificación de HxR e Hx es relevante debido a que la acumulación en el músculo de uno o de otro es determinante en la predicción del valor K. En este experimento ambos metabolitos fueron detectados al momento de la captura en concentraciones $\leq 0.05 \mu\text{mol/g}$ de músculo, lo cual concuerda con Howgate (2005) quien reportó concentraciones molares de éstos en el rango de 0.0 a 0.5 $\mu\text{mol/g}$ en estudios que comprendieron 25 organismos marinos.

Durante las primeras 5 horas posmortem los únicos metabolitos que aumentaron su concentración como resultado de la degradación del ATP fueron ADP, AMP e Hx. El aumento en ADP se debe a la defosforilación de ATP; asimismo, la acumulación de AMP pudiera ser atribuido a la acción de la enzima adenilato quinasa actuando sobre ADP, para poder de esta manera resintetizar ATP (Davuluri y col., 1981).

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio, la concentración molar de ATP disminuye considerablemente en 24 horas, decreciendo de 6.54 a 0.41 $\mu\text{mol/g}$. Lo anterior concuerda con Yoshioka y col. (2003), quienes estudiaron la degradación de este nucleótido en manto de calamar (*Tadarodes pacificus*) enhielado,

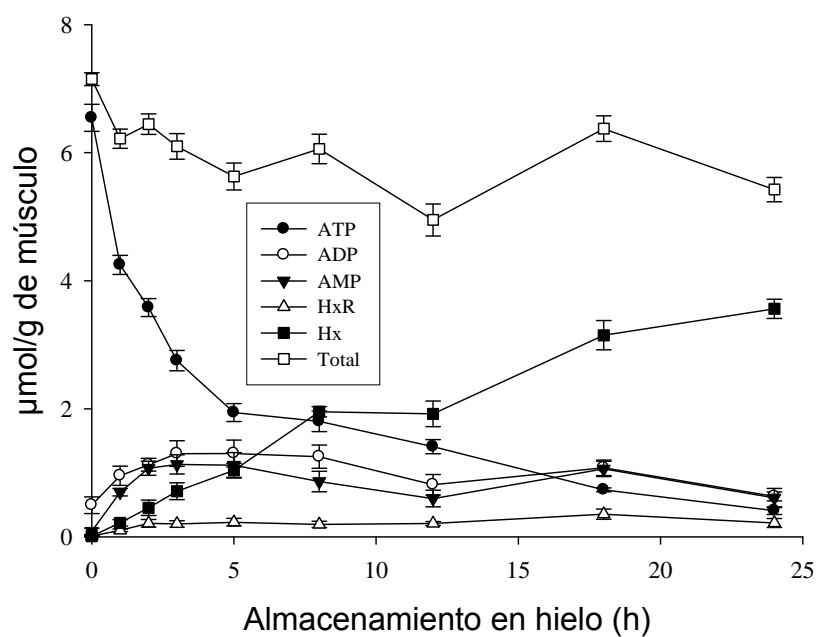


Figura 7. Degradación del ATP y sus productos durante las primeras 24 horas posmortem de manto de calamar almacenado en hielo. Los valores representan la media y desviación estándar de 6 calamares.

reportando una reducción de 9.1 $\mu\text{mol/g}$ a 0.2 $\mu\text{mol/g}$ en el mismo periodo. En el trabajo de Yoshioka y col. (2003), la degradación del ATP se reflejó en la acumulación de AMP e Hx, en donde Hx aumento linealmente de 0 $\mu\text{mol/g}$ a 4.3 $\mu\text{mol/g}$ a las 48 h posmortem; en este estudio, esta degradación se evidenció únicamente en el aumento significativo ($p \leq 0.05$) y lineal de Hx, alcanzando una concentración de 3.56 $\mu\text{mol/g}$ a las de 24 h de almacenamiento.

Es importante señalar que en este estudio tanto IMP como Ado aparecieron en concentraciones detectables en algunos mantos, pero no en todos, sugiriendo la habilidad fisiológica de *Dosidicus gigas* de degradar ATP a Hx vía IMP y vía Ado.

Después de 24 horas de almacenamiento en hielo, el principal producto de degradación endógena fue Hx alcanzando esta una concentración de 6.85 $\mu\text{mol/g}$ al día 15 (Figura 8), es decir, prácticamente todo el ATP inicial fue degradado a Hx. Lo anterior indica un patrón de degradación del ATP distinto al reportado para la mayoría de los peces, donde el metabolito más abundante después de 24 h de almacenamiento es el IMP, el cual posteriormente se degrada paulatinamente a HxR e Hx (Ohashi y col., 1991; Saito y col., 1959). Similar a estos resultados, Shirai y col. (1997) reportaron en calamar *Boreal gonatopsis* la ausencia de IMP dentro de las primeras 24 horas de almacenamiento en hielo. Así pues el aumento en la concentración de Hx inmediatamente después de la captura, es una característica peculiar de estos organismos (Segedhal y col., (1997).

Los resultados detectados indican que *Dosidicus gigas* es una especie acumuladora de Hx y no de HxR ($\text{Hx}/\text{HxR} = 86.4$) tomando en cuenta la clasificación de Ehira y Uchiyama (1987), donde la relación Hx/HxR al final del almacenamiento debe de ser igual o mayor a 5 para considerar a la especie como acumuladora de Hx.

Debido a las bajas concentraciones de HxR e Hx detectadas al tiempo cero, el valor inicial experimental de IK fue de 0.29 % con un incremento lineal a 73 % a las 24 horas de almacenamiento ($y = 2.81x + 5.6$; $R^2 = 0.9716$; $p \leq 0.001$), (Figura 9). Yoshioka y col. (2003) reportaron un

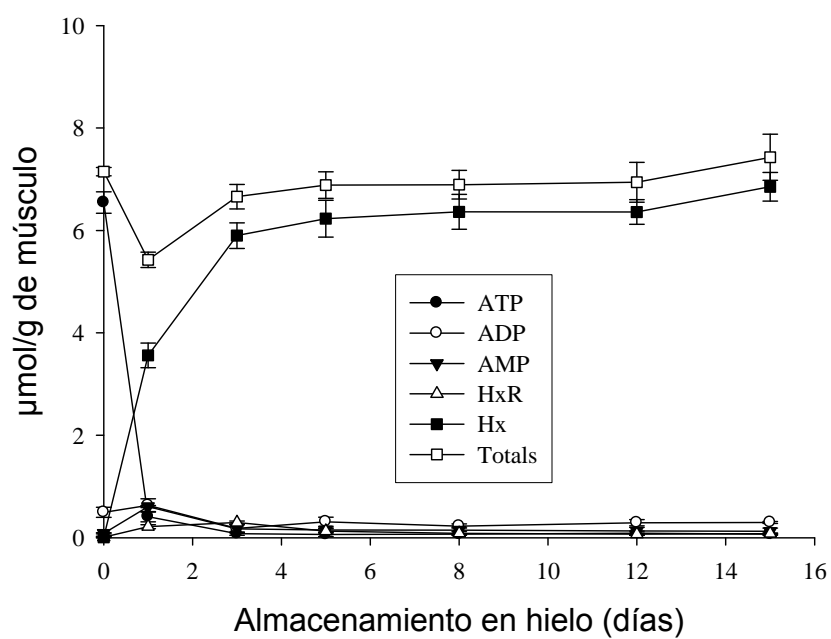


Figura 8. Degradación del ATP y sus productos en manto de calamar gigante almacenado en hielo. Los valores representan la media y desviación estándar de 6 calamares.

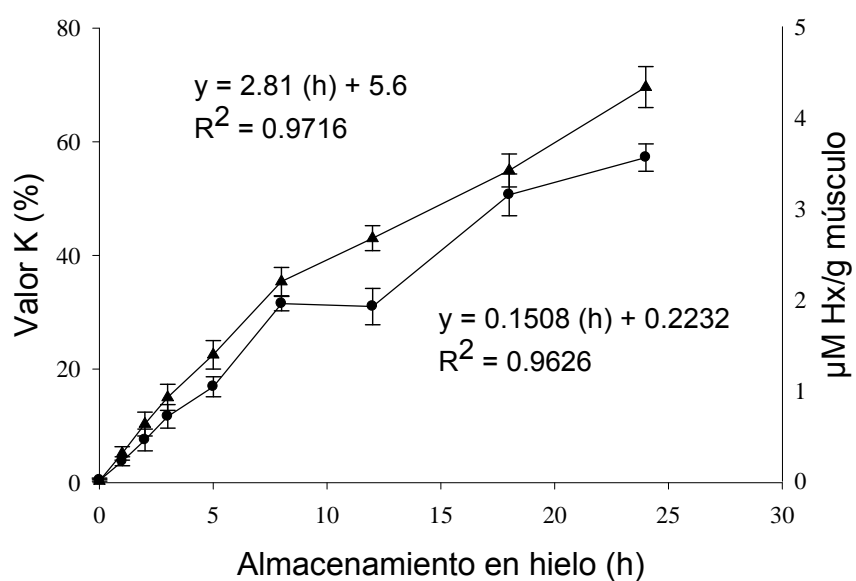


Figura 9. Comportamiento de valor K (▲) e Hx (●) durante las primeras 24 h posmortem en manto de calamar gigante almacenado en hielo. Los valores representan la media y desviación estándar de 6 calamares.

comportamiento lineal del IK en calamar (*Tadarodes pacificus*) almacenado en hielo de 0 % (t = 0) a 40 % (t = 48 h). La continua acumulación de Hx en *Dosidicus gigas* (Figura 9) respecto al tiempo de almacenamiento en las primeras 24 h posmortem muestra una tendencia lineal ($y = 0.151x + 0.22$; $R^2 = 0.9626$; $p \leq 0.001$) lo cual, al igual que el valor K, indica su utilidad en la estimación de reducción de frescura en las primeras horas posmortem.

El comportamiento del valor K e Hx pierden su linealidad observándose un cambio de pendiente después del primer día de almacenamiento (Figura 10). Esta pérdida de linealidad causada por la rápida formación de Hx en las primeras horas posmortem demuestra la reducida aplicación del valor K como un índice de frescura para calamar gigante, ya que para la mayoría de los pescados el valor K sigue un comportamiento lineal durante periodos prolongados de almacenamiento en hielo (≥ 15 d) (Ryder, 1985; Ohashi y col., 1991; Kaminishi y col., 2000).

Se ha documentado que el valor K es dependiente de la especie, en donde valores de 20 a 60 % se consideran dentro del rango aceptable para consumo humano para la mayoría de las especies de pescado. Así pues, un valor K de 20 % se establece como el límite de frescura y de 60 % como el de rechazo (Sikorski y Karnicki, 1990). De igual manera, Cox y Karahadian (1980) reportaron que un producto pesquero con valor $K \leq 20$ % es un producto fresco, ≤ 50 % es moderadamente fresco y ≥ 70 % no es apto para consumo. Lo anterior aplicado en términos estrictos a los resultados detectados para manto de calamar gigante pondría de manifiesto que dicho músculo sería inapropiado para consumo humano después de 24 horas de almacenamiento en hielo. Esto último resulta ilógico, ya que Morán (2002) reportó valores de TMA en el músculo de la misma especie, el cual denota deterioro bacteriano en productos pesqueros, por debajo de los niveles máximos permisibles (5-10 mg N-TMA/100g) (Woyewoda y col., 1986) a los 15 días de almacenamiento en hielo.

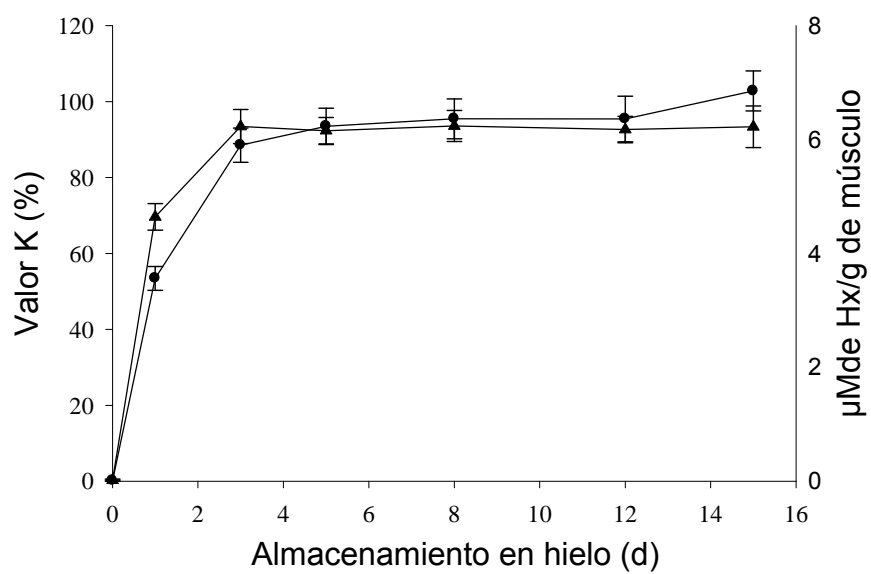


Figura 10. Comportamiento del valor K (▲) e Hx (●) en manto de calamar gigante almacenado en hielo. Los valores representan la media y desviación estándar de 6 calamares.

Purificación de AMP Deaminasa del Manto de Calamar Gigante

La purificación de la enzima AMP deaminasa se sujeto en una primera parte al protocolo de purificación establecido por Smiley y col. (1967) mediante cromatografía en celulosa fosfato, obteniéndose una recuperación del 34.8 %, muy similar al reportado por estos autores (36 %) (Cuadro 3).

La enzima AMP deaminasa eluyó a una concentración de 0.50 M de KCl (Figura 11). En un estudio realizado en músculo blanco de conejo, la AMP deaminasa se eluyó de celulosa fosfato a una concentración 0.4 M de NaCl, una isoforma en músculo rojo de la misma especie a una concentración 0.35 M de NaCl (Ogasawara y col., 1983), mientras que la AMP deaminasa de estomago de gallina a una concentración de 1.45 M de KCl (Swieca y col., 2004). Lo anterior indica diferencias en el perfil de elusión de AMP deaminasa por efecto de la concentración salina dependiendo de la fuente de extracción de la enzima, lo cual esto es una característica inherente de cada enzima.

Trabajos previos (Dutka y col., 2004; Smiley y col., 1967) reportan que la purificación de esta enzima requiere solo de la cromatografía en celulosa fosfato. Sin embargo, en el presente trabajo dicha enzima tuvo que ser sometida a subsecuentes estrategias de purificación. El monitoreo de la pureza se siguió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en donde la cromatografía en celulosa fosfato, mostró un gran número de bandas de proteína (Figura 12), indicando la necesidad aplicar alternativas de purificación complementarias. Los resultados observados al respecto coinciden con los detectados por otros investigadores (Takkar y col., 1993), quienes reportaron que celulosa fosfato no es suficiente para purificar a AMP deaminasa.

Takkar y col. (1993), establecieron un procedimiento de purificación para AMP deaminasa de corazón de conejo utilizando cromatografía en celulosa fosfato, seguida de filtración en gel y finalmente cromatografía por afinidad en 5'-AMP sefarosa, tal como se realizó en el presente estudio.

Cuadro 3. Purificación de AMP deaminasa del manto de calamar gigante

Fracción	Proteína mg/mL	Act. total U	Act. Esp. U/mg	Recuperación %	Purificación
Extracto crudo	2.22	33.24	0.0187	100	1
Celulosa fosfato	0.43	11.58	0.3146	34.80	16.57
Q-Fast	0.45	6.16	0.6620	18.53	35.40
5'-AMP sefarosa	0.05	1.50	2.5000	4.50	133.68

U: μM de IMP/min/mg de proteína

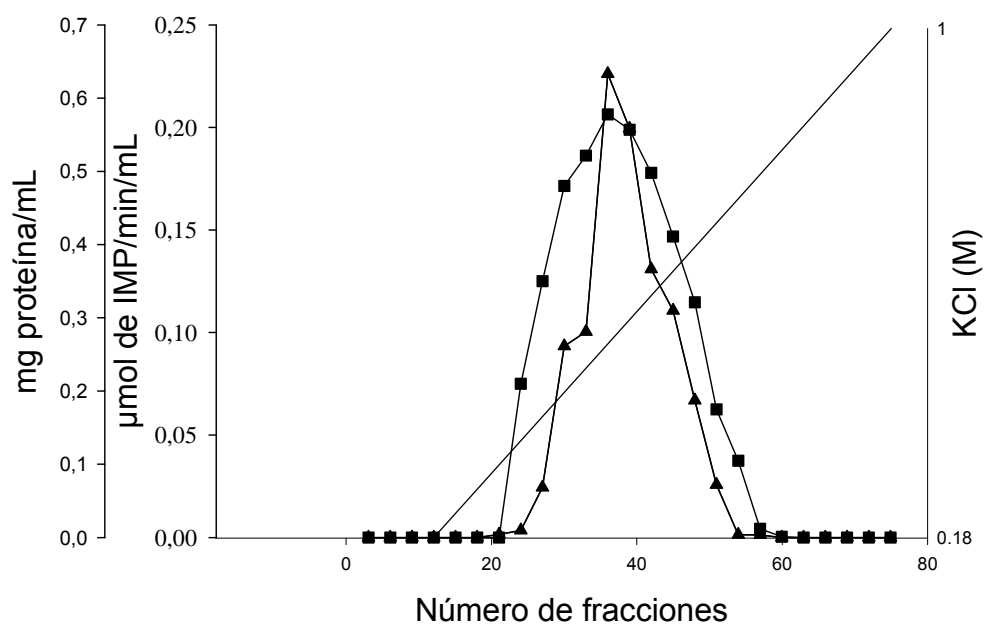


Figura 11. Cromatografía en celulosa fosfato. Elución con un gradiente lineal con KCl de 0.18 a 1.0 M. Proteína (■), actividad AMP deaminasa (▲), KCl (-).

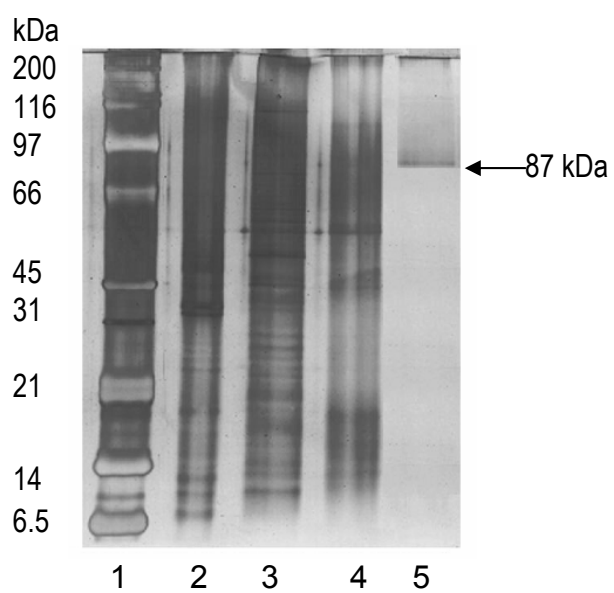


Figura 12. SDS-PAGE durante purificación de AMP deaminasa. Gel de poliacrilamida al 14 %, las bandas de proteínas fueron teñidas con nitrato de plata. Línea 1, estándar de amplio rango (biorad); línea 2, extracto crudo; línea 3, pool de cromatografía en celulosa fosfato; línea 4, pool de Q-Fast; línea 5, pool de 5'-AMP sefarosa.

Se elaboro un pool con las fracciones 27-45 resultantes de la cromatografía en celulosa fosfato, se dializaron y se aplicaron a Q sefarosa fast flow (Q-Fast), una resina intercambiadora aniónica similar a la DEAE celulosa. A la fecha, Q-Fast no ha sido empleada ampliamente en la purificación de esta enzima, por lo que trabajos previos reportan el uso de DEAE celulosa como una herramienta en su purificación (Ranieri-Raggi, y col.,1997). Como resultado de este paso cromatográfico se obtuvo un pool de las fracciones 6-11 cuya concentración de proteína fue de 0.45 mg/mL con 6.16 unidades totales de actividad y una actividad específica de 0.662 U/mg, para obtener así un rendimiento del 18.5 % y un número de purificación de 35.4 (Cuadro 3). La enzima eluyó a una concentración de 0.35 M de KCl (Figura 13). Stankiewicz (1982) purifico AMP deaminasa de músculo de langostino en DEAE celulosa después de una precipitación con sulfato de amonio y obtuvo un rendimiento de 36 %, igual al reportado por Smiley y col. (1967) utilizando cromatografía en celulosa fosfato.

Poco se ha utilizado la cromatografía en 5'-AMP sefarosa como herramienta de separación en la purificación de AMP deaminasa; esta se ha utilizado más bien en la purificación de 5'-nucleotidasa. En el presente trabajo, el uso de 5'-AMP sefarosa (Figura 14) brindo buenos resultados, obteniéndose 1.5 unidades totales de actividad, una actividad específica de 2.5 U/mg, y un rendimiento del 4.5 %, como resultado final del proceso de purificación, aumentando con esto el número de purificación de 35.4 a 133 veces. Takkar y col. (1993) purificaron AMP deaminasa de corazón de conejo utilizando al final del proceso de purificación 5'-AMP sefarosa como herramienta cromatográfica logrando recupera el 45 % de las unidades inyectadas a la columna aumentando así el número de purificación de 300 a 650.

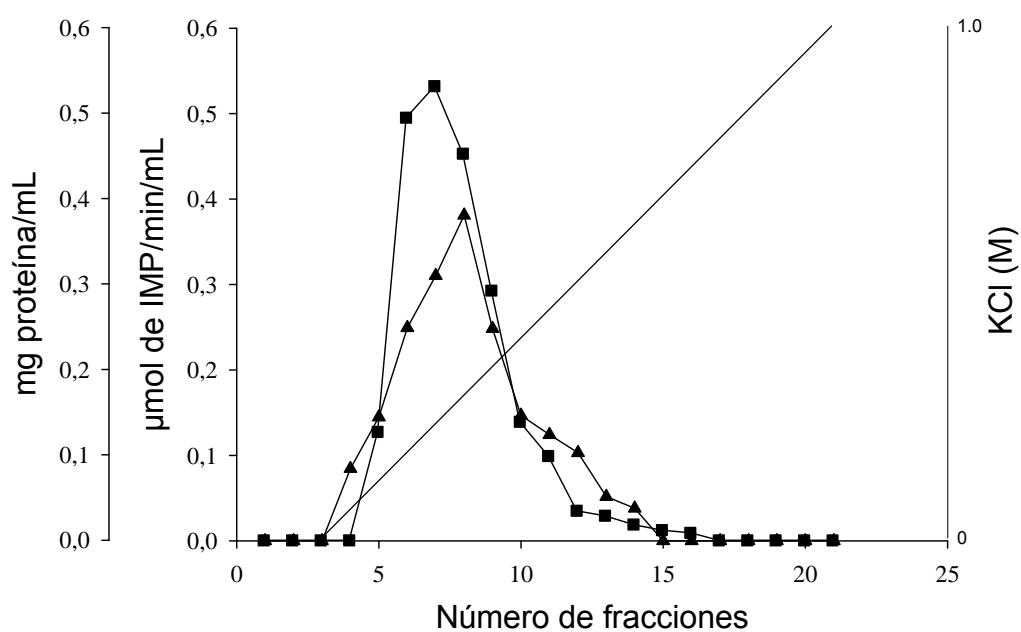


Figura 13. Cromatografía en Q sefarosa fast flow. Elución con un gradiente lineal de KCl de 0 a 1.0 M. Proteína (■), actividad AMP deaminasa (▲) y KCl (-).

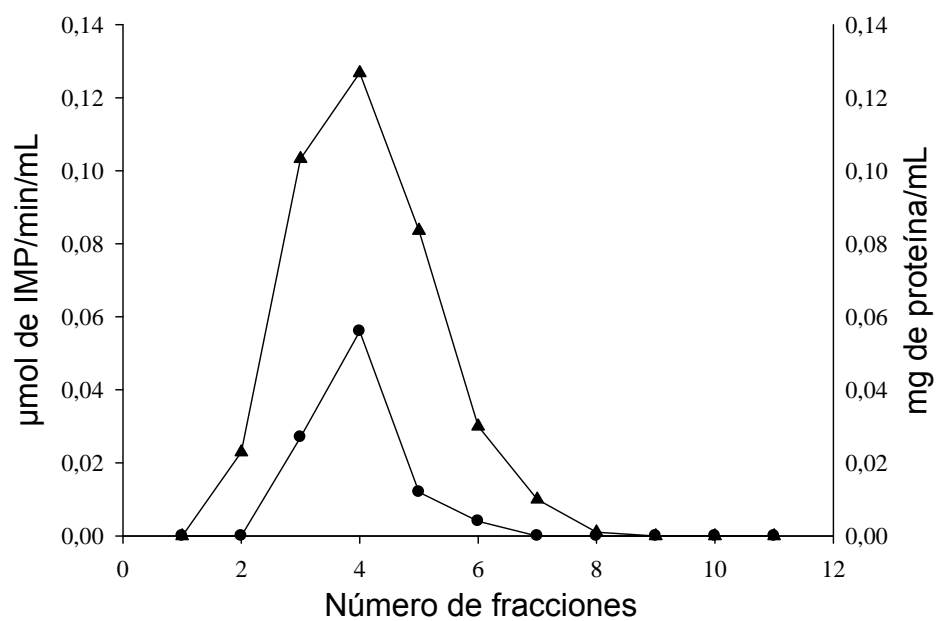


Figura 14. Cromatografía en 5'-AMP sefarosa. Elución con AMP 20 mM. Proteína (●), actividad (▲).

Caracterización de AMP Deaminasa

SDS-PAGE, PAGE Nativo y Filtración en Gel

Se utilizó SDS-PAGE para monitorear el proceso de purificación de la enzima. En el presente estudio se obtuvo una sola banda de proteína con peso molecular (PM) de 87 kDa después de la cromatografía en 5'-AMP sefarosa, indicando con esto la pureza de la enzima (Figura 12). Al analizar la muestra mediante electroforesis nativa se observó una banda de 178 kDa (Figura 15), lo cual indica una naturaleza homodimérica de la enzima, en donde la asociación de sus subunidades es mediante interacciones no covalentes. Complementariamente, la filtración en gel reforzó estos resultados al obtener un PM de 180 kDa (Figura 16). La enzima AMP deaminasa se ha estudiado poco en organismos marinos, y muchos menos en invertebrados, existiendo de esta manera poca información que ayude a contrastar los resultados.

Stankiewicz y col. (1979) purificaron AMP deaminasa de perca (*Sander lucioperca*) reportando un PM de 280 kDa, con lo cual propusieron una estructura homotetramérica con subunidades de 70 kDa. En otro estudio, Ranieri-Raggi y col. (2003) purificaron esta enzima en músculo esquelético de conejo y reportaron un PM en SDS-PAGE de 85 kDa. Cabe mencionar que para la mayoría de las AMP deaminasas purificadas de diferentes fuentes, se reporta un PM de aproximadamente 70 kDa, aunque el gen que codifica para la misma (AMPD1) generaría una proteína de 90 kDa (Hisatome y col., 1998). Esta disminución en PM puede atribuirse a la acción proteolítica de enzimas presentes durante el procedimiento de purificación, como lo reportó Takkar y col. (1993). Los resultados sugieren que en este estudio la AMP deaminasa no sufrió esta hidrólisis ya que el PM (SDS-PAGE) fue de 87 kDa, muy cercano al de 90 kDa reportado por Hisatome y col. (1998) (Figura 12).

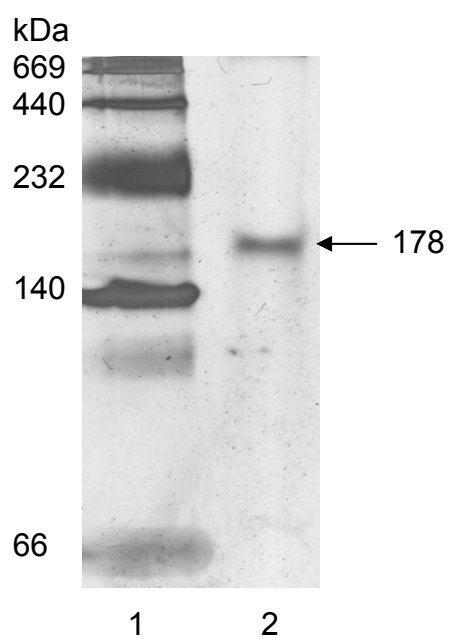


Figura 15. PAGE nativo de AMP deaminasa. Gel de poliacrilamida al 8 %, las bandas de proteínas fueron teñidas con nitrato de plata. Línea 1, estándar nativo de amplio rango (biorad); línea 2, pool de 5'-AMP sefarosa.

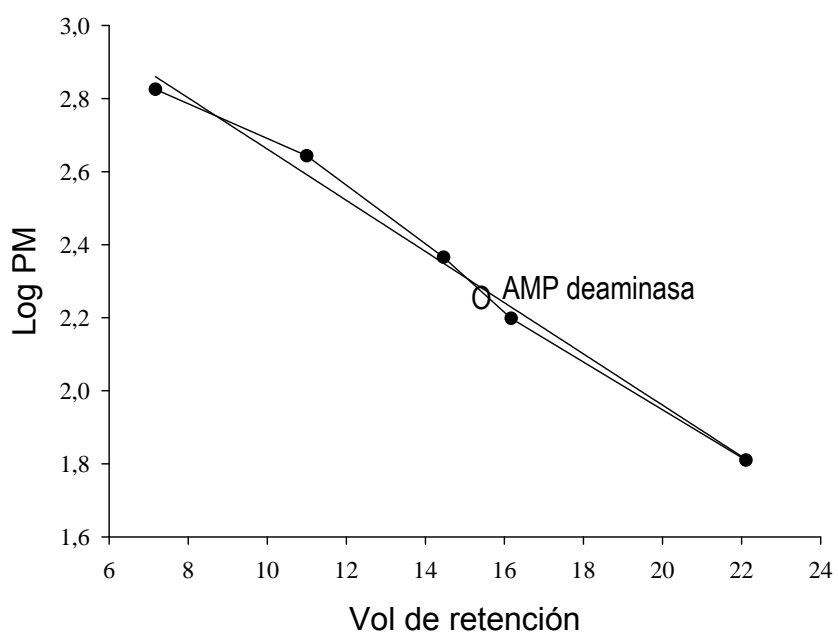


Figura 16. Estimación del peso molecular nativo de AMP deaminasa en superdex 200. El logaritmo del peso molecular fue graficado contra el volumen de elución. El pico de elución fue determinado por densidad óptica (absorbancia a 280 nm) y por actividad AMP deaminasa.

Punto Isoeléctrico

El punto isoeléctrico (pI) de la AMP deaminasa fue de 5.76 (Figura 17), concordando con lo reportado por Stankiewicz (1982) para langostino (*Procambarus clarkii*) (pI = 5.8-6.1). Stankiewicz y Sychala (1981) investigaron los pI's de la enzima de músculo blanco de conejo, músculo blanco de gallina, músculo rojo de gallina, músculo de rata, músculo de perca y músculo de rana, reportando valores de 4.79, 5.02, 4.93, 4.33, 4.55 y 4.80, respectivamente, argumentando con esto un pI menor para la enzima de vertebrados. Boosman y Chilson (1976) cuantificaron los aminoácidos de AMP deaminasas de músculo de gallina y conejo, reportando una predominancia de los aminoácidos ácidos aspártico y glutámico sobre los básicos lisina y arginina. Lo anterior explica los valores de pI en la región ácida para estas AMP deaminasas, confirmando el resultado obtenido en el presente estudio.

Complementando lo anterior, el isoelectroenfoque confirmó la purificación de la AMP deaminasa del manto de calamar gigante. El pool resultante de cromatografía en 5'-AMP seferosa brindó una sola banda en SDS-PAGE (Figura 12), una sola banda en PAGE nativo (Figura 15), un solo pico de elución en filtración en gel (Figura 16), así como una sola banda en isoelectroenfoque (Figura 17); todas estas herramientas en conjunto señalan la pureza de la enzima purificada en este estudio.

Con frecuencia, SDS-PAGE o PAGE nativo resultan en una sola banda durante la purificación de una enzima o proteína, pero al realizar isoelectroenfoque ésta se desdobra en más de una banda, indicando con ello la existencia de proteínas de igual o muy similar PM pero distinto pI; es decir, proteínas distintas. De ahí la importancia de realizar una segunda electroforesis, como isoelectroenfoque, en donde la separación se da en función de la carga neta de la proteína.

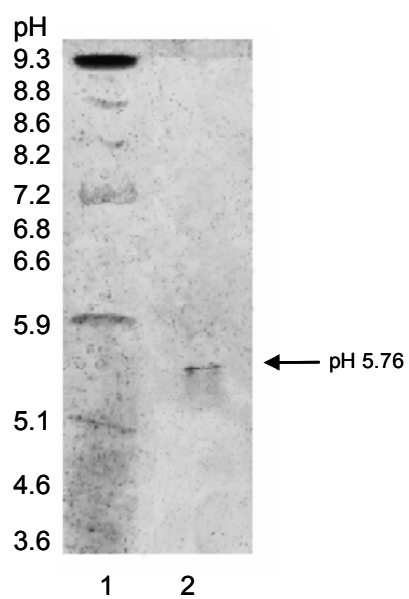


Figura 17. Isoeléctroenfoque en fast system de AMP deaminasa purificada del manto de calamar gigante. Línea 1, estándar sigma-aldrich de 3.6 – 9.3; línea 2, AMP deaminasa purificada.

Temperatura Óptima de Acción

La temperatura óptima de actividad de la AMP deaminasa fue de 35 °C (Figura 18). Existe poca información sobre la temperatura óptima de acción de esta enzima. La mayoría de los trabajos se enfocan al estudio de su regulación por activadores e inhibidores en el músculo esquelético, generalmente en el rango de 25 a 37 °C (Norman y col., 1998).

Es importante resaltar la importancia de la reducida actividad de esta enzima a bajas temperaturas (<10 °C), ya que en párrafos anteriores se ha discutido que la degradación de AMP en el manto ocurre rápidamente. No obstante la actividad de la AMP deaminasa en el rango de 0-10 °C fue sumamente baja en comparación con su actividad óptima a 35 °C, la degradación de este nucleótido ocurre durante el almacenamiento enhielado del manto. La posible explicación a este fenómeno se analiza y discute en detalle en la sección correspondiente a la caracterización de la enzima 5'-nucleotidasa, la cual mostró una mayor eficiencia catalítica y menor K_m que la AMP deaminasa. Aunado a lo anterior, en ocasiones suele ser difícil extrapolar los resultados *in vitro* a lo que sucede *in vivo*, donde intervienen una serie de factores que actúan como reguladores de los eventos bioquímicos que acontecen dentro de una célula.

Estabilidad a la Temperatura

La termoestabilidad de la AMP deaminasa ha sido también poco estudiada en productos pesqueros; sin embargo, considerando que estos productos atraviesan varias etapas desde su captura hasta su almacenamiento, es necesario estudiar la estabilidad de esta enzima principalmente a temperaturas elevadas en donde la actividad enzimática se ve potenciada. Por otra parte, la literatura reporta que la mayoría de las enzimas son estables a bajas temperaturas (Fennema, 1996).

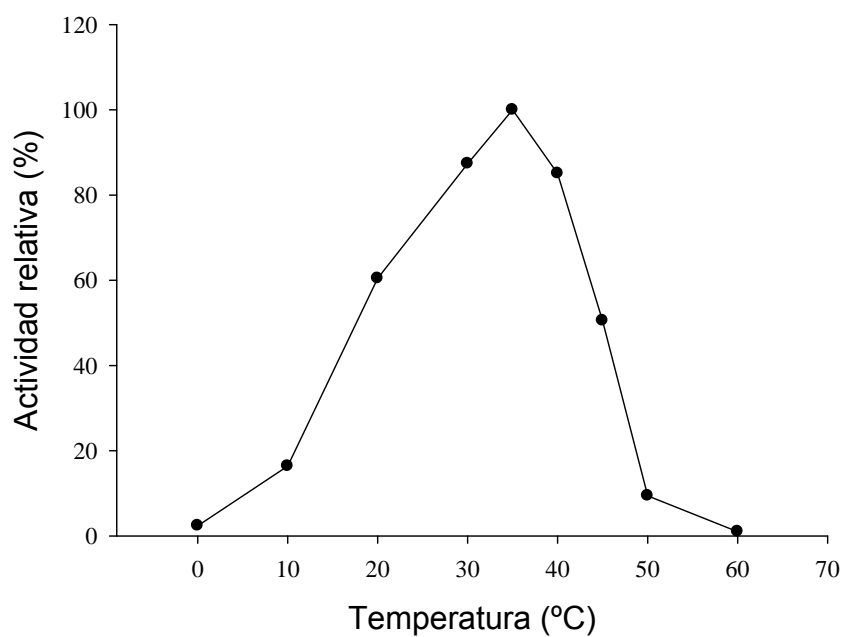


Figura 18. Temperatura óptima de acción de AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio 40 mM, pH 6.0 y KCl 0.18 M.

La estabilidad de la AMP deaminasa disminuyó con el aumento en la temperatura de incubación (Figura 19). La mayor estabilidad de la actividad enzimática fue a 30 °C, con una actividad remanente 68 %, mientras que a 35, 40, 45 y 50 °C fue de 62, 52, 25 y 8 % respectivamente. Raffin y Leray (1979) estudiaron la termoestabilidad de la AMP deaminasa de trucha (*Salmo gairdneri R*) a temperaturas de 0, 12.5, 25 y 37 °C. En los primeros tres casos la actividad remanente aumento considerablemente; sin embargo, a 37 °C después de una hora de incubación la actividad residual fue del 30 %. Estos investigadores explicaron este aumento en la actividad residual en función de una posible proteólisis de la AMP deaminasa, la cual pudiera causar su activación. Los datos observados indican que la estabilidad de esta enzima es relativamente baja en comparación con la AMP deaminasa purificada por Raffin y Leray (1979).

pH Óptimo de Acción

Normalmente la actividad de esta enzima fluctúa en el rango de pH de 5.5 a 7.5 (Martini y col., 2001). El pH óptimo de acción para AMP deaminasa de manto de calamar gigante fue de 6.0 (Figura 20), coincidiendo con lo reportados para músculo de conejo (6.0) (Ya-Pin, 1957), escorpión marino (*Scorpaena sp*)(6.5) (Lushchak y col., 1998), y langostino (*Cambarus sp*)(6.5) (Stankiewicz, 1982). Resulta relevante que el pH óptimo de acción de esta enzima en el manto de calamar gigante fue de 6, ya que el pH del músculo posmortem durante su almacenamiento por 15 días en hielo osciló entre 6.0 y 6.2, según lo reportado por Morán (2002) para la misma especie. El comportamiento del pH durante el almacenamiento del calamar suponen condiciones óptimas para la actividad de la enzima respecto a este variable. Lo anterior puede tener una mayor repercusión en la de gradación de AMP del manto si consideramos que durante la pesca artesanal el calamar se mantiene a temperatura ambiente, lo cual favorecería una mayor actividad de la enzima.

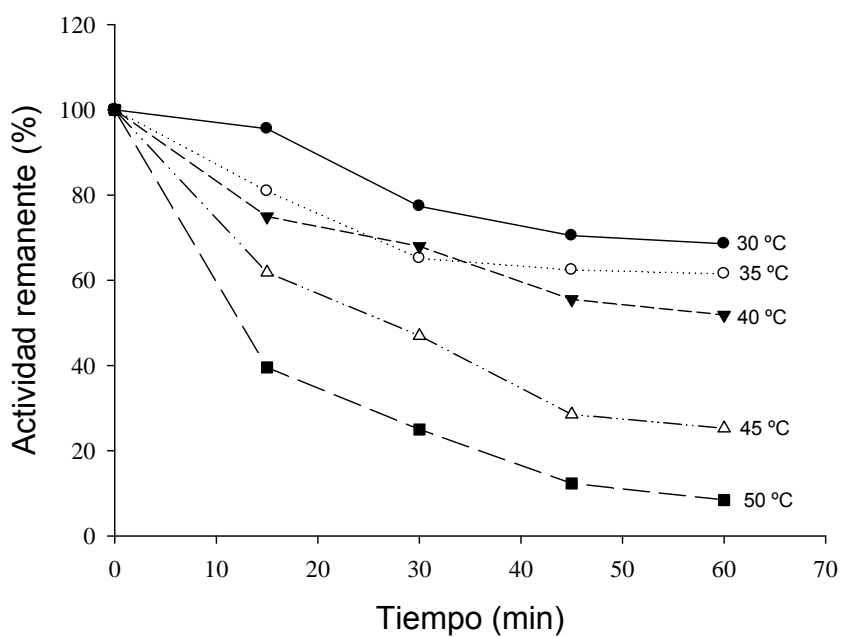


Figura 19. Estabilidad a la temperatura de AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático incubado + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio 40 mM, pH 6.0 y KCl 0.18 M, 35 °C.

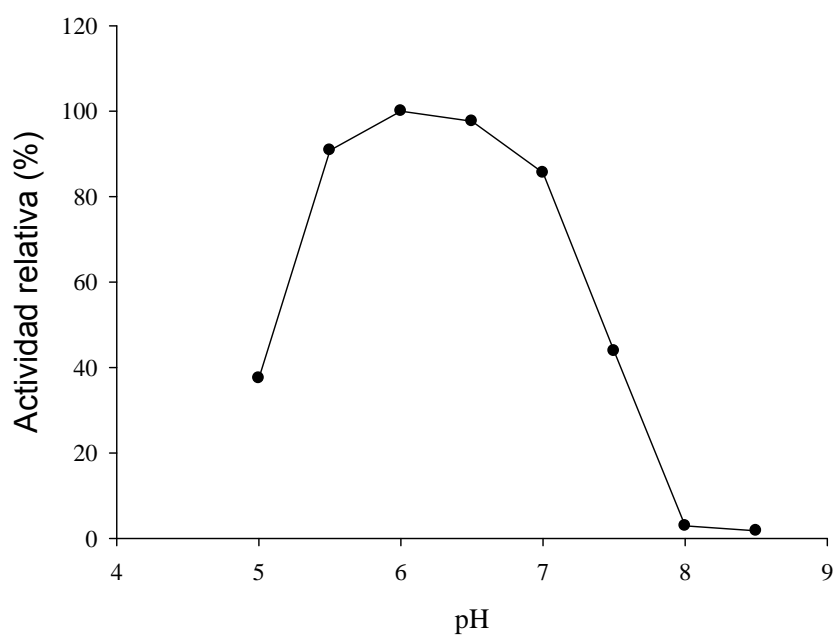


Figura 20. pH óptimo de acción de AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio o TRIS-HCl 40 mM, a distintos pH's y KCl 0.18 M.

Estabilidad al pH

La AMP deaminasa fue sumamente estable a pH 6.0 y 5.5 principalmente. Su actividad residual después de 60 min de incubación a pH 6.0 fue de 108 %, mientras que a pH 5.5 de 102 %. Complementariamente, la actividad remanente detectada para pH 5.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5, fue de 20, 80, 37, 10, 3 y 2 %, respectivamente (Figura 21). Raffin y Leray (1979) trabajando con AMP deaminasa de branquias de trucha, incubaron la enzima por 10 horas en el rango de pH 6.0-7.5 y no observaron diferencias respecto a la estabilidad de la enzima tanto en extracto crudo como purificada. Por otra parte, al realizar el mismo experimento en un extracto crudo sin inhibidores de proteasas, la actividad remanente supero al 100 % durante todo el periodo de incubación y en todo el rango de pH estudiado, atribuyendo sus resultados a la activación de AMP deaminasa por efecto de las proteasas existentes en el extracto crudo.

Poca información existe sobre la estabilidad de esta enzima al pH. Su estudio se ha enfocado principalmente al conocimiento de su función y regulación dentro de la célula, en donde el pH de trabajo es el fisiológico.

Considerando la estabilidad de esta enzima a pH de 6.0 y el pH del músculo posmortem (6.0-6.2) del calamar gigante reportado por Moran (2002), nos lleva a suponer que la AMP deaminasa es una enzima importante en la degradación del AMP del manto de calamar; es decir, inmediatamente después de la captura del organismo existen las condiciones apropiadas de temperatura y pH en el músculo para que AMP deaminasa actúe bajo condiciones favorables.

Efecto del KCl

El efecto del K^+ sobre la actividad de AMP deaminasa se ha estudiado en una gran variedad de enzimas (Lushack y col., 1998). En la mayoría de los casos, el K^+ actuó como activador de la enzima. En el presente estudio con AMP deaminasa de calamar gigante, el efecto de este ión fue negativo

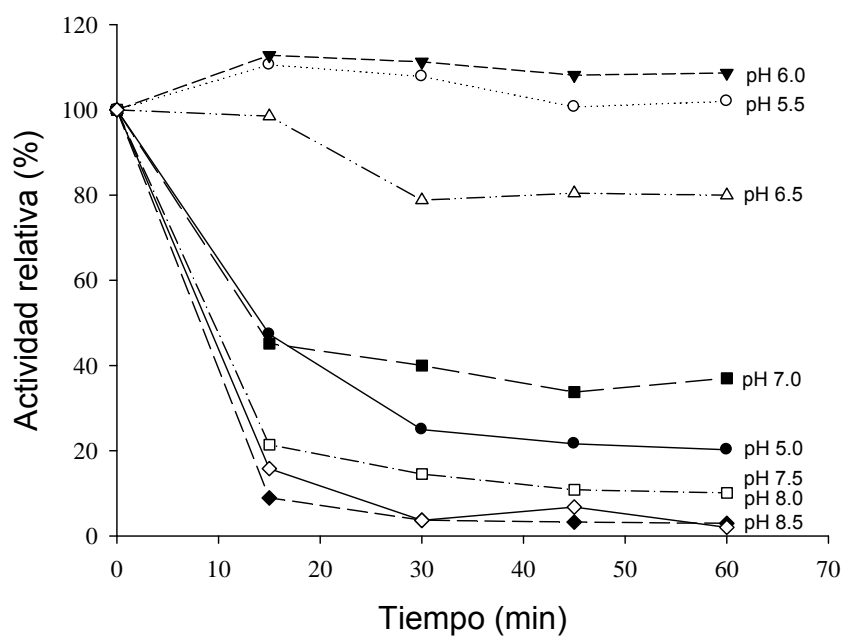


Figura 21. Estabilidad al pH de AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático incubado + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio 40 mM, pH 6.0 y KCl 0.18 M, 35 $^{\circ}$ C.

conforme aumentó su concentración (Figura 22). Existen pocos estudios en donde se haya observado un efecto similar. Ashby y Holmsen (1981), evaluando el efecto de este ión sobre AMP deaminasa de plaquetas humanas, observaron una disminución en su actividad hasta un 40 % a una concentración de 500 mM de KCl. En otro estudio Mahnke-Zizelman y Sabina (2002), trabajando con eritrocitos humanos reportaron que para la isoforma E de AMP deaminasa unida a membrana no se detectó diferencia de actividad en ausencia o presencia de KCl 150 mM. Por otra parte, Lushchak y col. (1998) estudiando AMP deaminasa de músculo blanco de escorpión marino, encontraron un comportamiento de campana al evaluar el efecto de KCl con un pico máximo de 140 % de actividad a 150 mM. Leray y col. (1979) obtuvieron un comportamiento similar al reportado por Lushchak y col. (1998), con un máximo de 180 % de actividad a 250 mM.

Efecto del ATP

La enzima AMP deaminasa posee sitios de unión para nucleótidos como ATP y ADP, los cuales puede influenciar positiva o negativamente su actividad. El efecto de ATP sobre AMP deaminasa de calamar gigante se presenta en la Figura 23. No se detectó un efecto activador en el rango de 0 a 2 mM; sin embargo, la activación se hizo presente en el rango de 2 a 4 mM.

La concentración de ATP en calamar recién capturado fue de 6.5 $\mu\text{M/g}$ de músculo (Figura 7), lo cual corresponde a 6.5 mM/kg. Considerando un contenido de humedad del 80 % en el músculo, un cálculo aproximado de su concentración molar es de 8.17 mM, lo que permite asumir que inicialmente existen niveles adecuados de ATP para actuar como un efector positivo en sobre la AMP deaminasa del manto de calamar gigante.

Swieca y col. (2004) estudiando AMP deaminasa de músculo liso de gallina reportaron un efecto activador del ATP a una concentración de 1 mM, disminuyendo su K_m de 4.43 a 1.02 mM. De igual forma, Spychala y col.

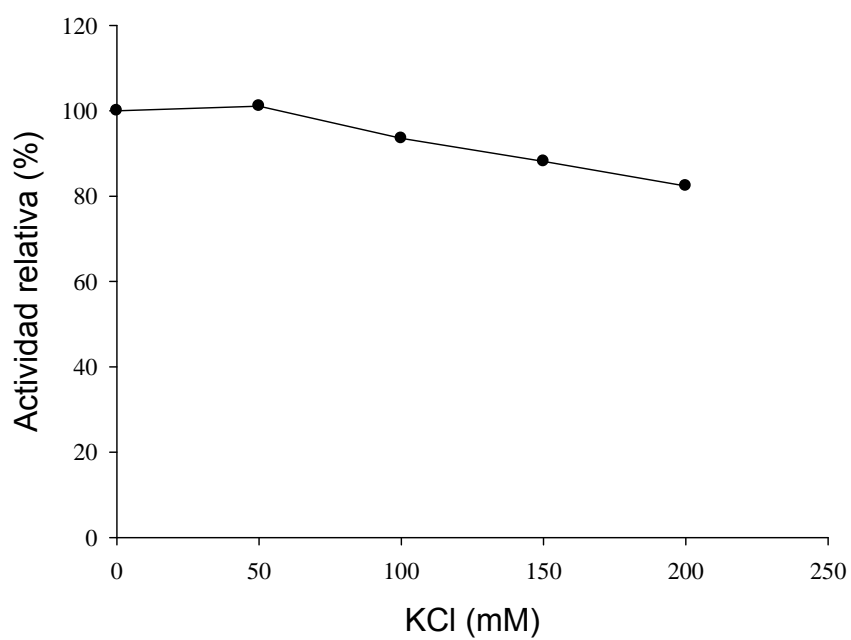


Figura 22. Efecto del KCl sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio 40 mM, pH 6.0 y KCl de 0 a 1000 mM, 35 $^{\circ}$ C.

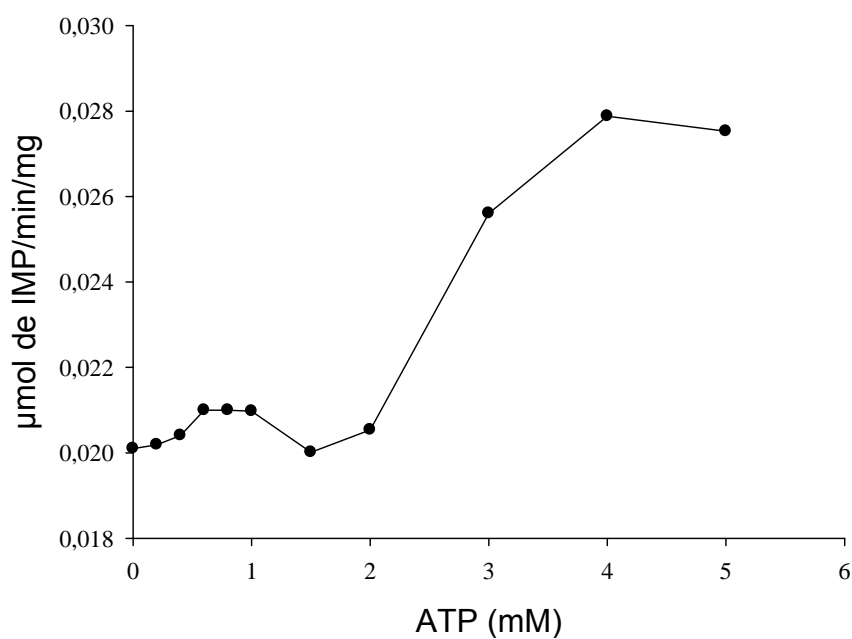


Figura 23. Efecto del ATP sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio 40 mM, pH 6,0, KCl 0,18 M y ATP en el rango de 0 a 5 mM, 35 $^{\circ}$ C.

(1985) evaluaron el efecto de ATP (3 mM) en la enzima de hígado de gallina, observando que su K_m disminuyó de 3.30 a 0.34 mM debido al efecto activador de este nucleótido. Por otra parte, Lushchak y col. (1998) estudiando el efecto de ATP sobre AMP deaminasa de escorpión marino, reportaron un nulo efecto activador del ATP en el rango de 0 a 0.4 mM, pero inhibición a concentraciones mayores, alcanzando un 50% a 1.2 mM.

La información publicada en la literatura indica que el efecto activador o inhibidor del ATP esta en función de la fuente de AMP deaminasa.

Efecto del ADP

La Figura 24 muestra el efecto del aumento de la concentración de ADP sobre la actividad AMP deaminasa. Se observó un efecto positivo en el rango 0 - 1.5 mM, alcanzándose un máximo de 140 % de actividad, para después presentar un efecto inhibitorio decayendo su actividad a concentraciones > 1.5 mM. Lushchak y col. (1998), reportaron resultados similares en escorpión marino observando que el ADP activó a la enzima a bajas concentraciones (0.1 - 1 mM), mostrando un pico máximo de activación del 175 % a 0.3 mM. Swieca y col. (2004) evaluaron el efecto de 1 mM de ADP en la enzima de músculo liso de gallina, observando un efecto activador al decrecer su K_m de 4.43 a 2.10. En otro estudio, Rundell y col. (1992) trabajando con AMP deaminasa de músculo de conejo observaron, de igual forma, un efecto activador del ADP en el rango de 0 a 80 μ M.

La literatura indica que la AMP deaminasa posee 3 sitios de unión para nucleótidos; su sitio activo de acción, un sitio inhibitorio el cual parece ser específico para nucleótidos trifosfato, y un sitio activador (Ashby y Friend, 1978). La unión de estos análogos de AMP a la enzima causa cambios conformacionales en la enzima afectando sus propiedades catalíticas. En enzimas donde se presenta un efecto inhibitorio de estos nucleótidos a bajas y a altas concentraciones, es probable que estos tengan una gran afinidad sobre el sitio de inhibición, o en su defecto logren

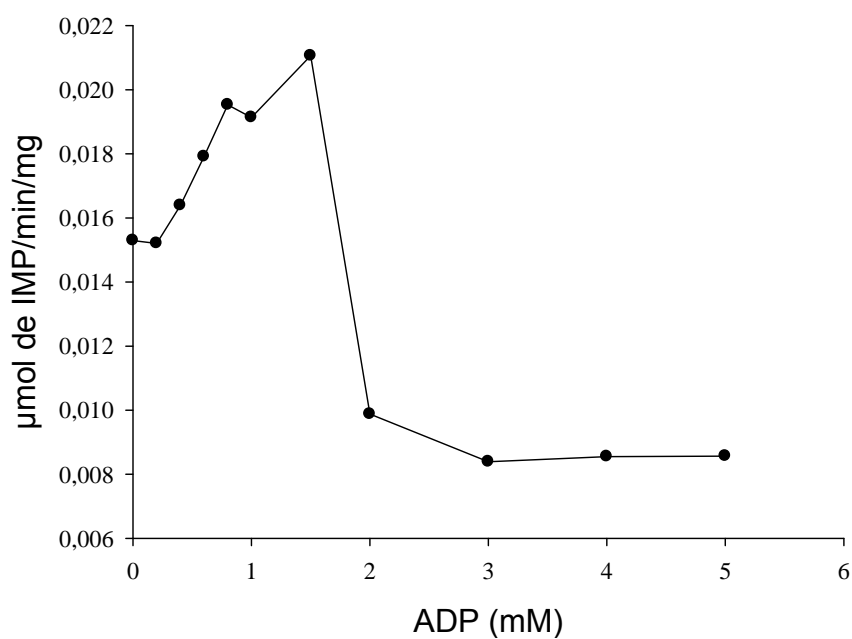


Figura 24. Efecto del ADP sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 100 μ L de extracto enzimático + 1000 μ L de AMP 20 mM en cacodilato de sodio 40 mM, pH 6,0, KCl 0,18 M y ADP en el rango de 0 a 5 mM, 35 $^{\circ}$ C.

actuar como un inhibidor competitivo. En aquellas donde se presenta un efecto activador similar a los resultados observados en este trabajo, es probable que la molécula del nucleótido actúe en un sitio alostérico causando un cambio conformacional el cual repercute en un aumento en la afinidad de su sustrato. De esta forma, cuando estos sitios alostéricos se saturan, el nucleótido análogo puede actuar como un inhibidor competitivo reduciendo de esta manera su actividad de una manera significativa.

Al igual que el ATP, el efecto activador o inhibitorio del ADP esta en función de la fuente de AMP deaminasa, así como también de las concentraciones en las que estos nucleótidos ejercen su efecto. La concentración molar de ADP en calamar recién capturado fue de 0.49 $\mu\text{mol/g}$ de músculo, lo cual corresponde a 0.49 mM/kg de músculo. Un calculo aproximando de la concentración molar de ATP considerando un contenido de humedad del 80 % en músculo de calamar sería de 0.61 mM, asumiendo de esta manera que existen niveles adecuados de ADP para actuar como un efector positivo en la AMP deaminasa del manto de calamar gigante. En las primeras 3 horas posmortem los niveles de ADP ascienden a 1.72 mM disminuyendo de esta manera su efecto inhibitorio, ya que el mayor efecto activador se logra a 1.5 mM.

Cinética

El estudio de las propiedades catalíticas de una enzima para la determinación de sus parámetros cinéticos, en la presencia o ausencia de efectores, es útil en el conocimiento de su actividad en su medio fisiológico. En este experimento se realizaron estudios cinéticos para determinar los parámetros intrínsecos de esta enzima, como son K_m , V_{max} y K_{cat} . Se determinaron las velocidades iniciales en el rango de sustrato de 0 a 45 mM, obteniendo como resultado un comportamiento sigmoidal, el cual es característico de enzimas multiméricas como es el caso de AMP deaminasa (Figura 25). Coffee y Solano (1977), obtuvieron para esta enzima en músculo esquelético de rata un comportamiento sigmoidal en la presencia de

KCl 5 mM, mientras que a 100 mM su comportamiento cinético cambio a hiperbólico con igual V_{max} y K_m muy similar. La literatura reporta que el comportamiento sigmoidal de AMP deaminasa puede ser transformado a hiperbólico en la presencia de ATP y ADP para obedecer a una cinética de Michaelis y Menten (Kaletha y Nowak (1988). Este comportamiento cinético resulta mas fácil analizar mediante la transformación de los datos a sus dobles recíprocos para obtener de esta forma las constantes K_m y V_{max} .

La AMP deaminasa de calamar gigante mostró una K_m de 13 mM, una V_{max} de 1.1 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteína y un coeficiente de Hill de 2.9. El cambio en la velocidad inicial (V_i) con respecto a la concentración de sustrato en el rango de 0 a 10 mM fue bajo, lo que indica una baja afinidad de la enzima dando como resultado un valor alto de K_m al compararlo con el de otras fuentes. Lushchak y col. (1998) estudiando AMP deaminasa de escorpión encontraron una K_m de 0.5 mM, mientras que Martini y col. (2001) trabajando con AMP deaminasa de músculo de conejo reportaron un valor de K_m de 0.5 mM.

El coeficiente de Hill indica el grado de cooperatividad de una enzima multimérica con relación a su sustrato. Valores >1 indican cooperatividad entre las subunidades de la enzima, lo que significa que la unión de una molécula de sustrato a una subunidad afecta la unión de otra molécula de sustrato a otra subunidad (Copeland, 2000). Los resultados de la cinética enzimática fueron los esperados para una enzima multimérica (Figuras 12, 15 y 16), con un comportamiento sigmoidal característico de una enzima alostérica (Figura 25). Su coeficiente de Hill fue de 2.9, indicando una alta cooperatividad entre las dos subunidades de la enzima. Mosharov y col. (1998) encontraron un comportamiento sigmoidal para esta enzima en eritrocito de humano, con un K_m de 4 mM, un coeficiente de Hill de 2.3 y una

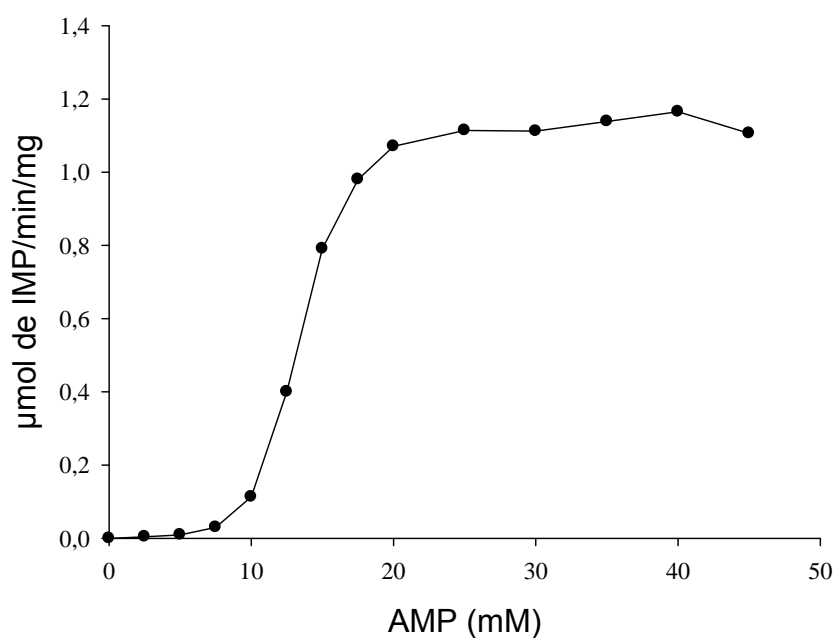


Figura 25. Efecto de la concentración de AMP sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar. Concentraciones de AMP: 2.5-45 mM; concentración de enzima: 2.5 μ g; buffer: cacodilato de sodio 40 mM, pH 6.0 y KCl 0.18 M, 35 $^{\circ}$ C.

V_{max} de 1.6 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$. Haas y Sabina (2003) estudiaron las tres isoformas de AMP deaminasa en humanos las cuales mostraron un comportamiento sigmoideal con coeficientes de Hill de 2.5, 2.5 y 3.2.

El comportamiento cinético obtenido para AMP deaminasa de calamar gigante fue el esperado considerando que es una especie invertebrada; es decir, una K_m alta y una V_{max} baja en relación a otras fuentes de AMP deaminasa. La literatura reporta una menor actividad de esta enzima en organismos invertebrados en relación a su contraparte de vertebrados (Fujisawa y Yoshino, 1987; Davuluri y col., 1981). Por otra parte, el comportamiento cinético de la enzima indica su papel fisiológico en el manto del calamar. Al ser una enzima multimérica y alostérica, puede regular las concentraciones de AMP de una manera muy eficiente; es decir, el sustrato puede acumularse con gran facilidad a niveles de AMP por debajo de su K_m , ya que a dichas concentraciones la enzima tiene poca afinidad por éste. Cuando dicha concentración se acerca al valor de su K_m , la enzima es altamente eficiente tal y como se muestra en la Figura 25.

Los valores de K_{cat} y la relación K_{cat}/K_m (eficiencia catalítica) fueron 3.48 moles de IMP s^{-1} y 267.7 $[(\text{mol}/\text{L})^{-1}\text{s}^{-1}]$, respectivamente. Estos valores son bajos si se comparan con los de organismos marinos vertebrados. La enzima del músculo esquelético de escorpión marino posee una K_{cat} de 205.3 $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica de 369,603 $[(\text{mol}/\text{L})^{-1}\text{s}^{-1}]$ (Lushchak y col., 1998). En otro estudio Leray y col. (1979), reportaron un valor de K_{cat} de 38.75 $\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica de 5613 $[(\text{mol}/\text{L})^{-1}\text{s}^{-1}]$, para AMP deaminasa de branquias de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*).

Purificación de 5'-nucleotidasa del Manto de Calamar Gigante

Se detectaron en el extracto crudo 3.55 mg proteína/mL, 1.93 unidades totales y una actividad específica de 0.0054 U/mg. Este extracto crudo se sometió a precipitación con sulfato de amonio al 55 %; se descartó el precipitado y se trabajó con el sobrenadante debido a que en esta fracción se detectó una mayor concentración de adenosina formada/min/mL. En este

último se detectó una concentración de 0.48 mg proteína/mL, una actividad específica de 0.0062 U/mg proteína, una recuperación del 85.49 % y un número de purificación de 1.14 (Cuadro 4).

El sobrenadante resultante de la saturación con sulfato de amonio se sometió a diálisis y se cargo en una columna concanavalina A (Figura 26). Este proceso cromatográfico es una de las más utilizadas en la purificación de esta enzima debido a la afinidad de esta resina por aquellas proteínas ricas en carbohidratos, como es el caso de 5'-nucleotidasa (Marseno y col., 1993a).

Se realizó un pool con las fracciones comprendidas entre 10 y 25, se obtuvieron 1.05 unidades totales, lo cual corresponde a un 63.63 % del total de unidades cargadas a la columna, así como una actividad específica de 0.77 U/mg proteína, aumentando el número de purificación a 142.59. Fini y col. (2003), purificaron 5'-nucleotidasa de plasma de toro utilizando en un segundo paso cromatográfico concanavalina A, tal como en el presente estudio. Recuperaron 68 % de las unidades totales cargadas a la columna y aumentaron la actividad específica de 0.8 a 20.6 U/mg proteína. De igual forma Grondal y Zimmermann (1987), purificando 5'-nucleotidasa de raya torpedo recuperaron un 56 % de las unidades totales cargadas a concanavalina A, aumentando de esta manera la actividad específica de 0.24 a 0.87 U/mg de proteína.

Los resultados experimentales del presente estudio, así como la información reportada en la literatura, indican que la purificación sobre concanavalina A es una buena herramienta para la purificación de esta enzima. Lo anterior se corroboró mediante SDS-PAGE (Figura 27), donde se observan pocas bandas proteicas presentes en el pool resultante de esta etapa del proceso de purificación (Cuadro 4).

El pool resultante de la cromatografía en concanavalina A se dializó y se cargo a la resina 5'-AMP sefarosa. Se cargaron 1.05 unidades de actividad y se recolectaron 0.25 representando el 23.8 % de las unidades

Cuadro 4. Cuadro de purificación de 5'-nucleotidasa

Fracción	Proteína mg/mL	Act. Total U	Act. Esp. U/mg	Recuperación %	Purificación
Extracto crudo	3.55	1.93	0.0054	100	1
Precipitación sulfato de amonio	0.48	1.65	0.0062	85.49	1.14
Concanavalina A	1.02	1.05	0.77	54.40	142.59
5'-AMP sefarosa	0.05	0.25	5.15	12.95	953.70

U: μ M de IMP formados por minuto

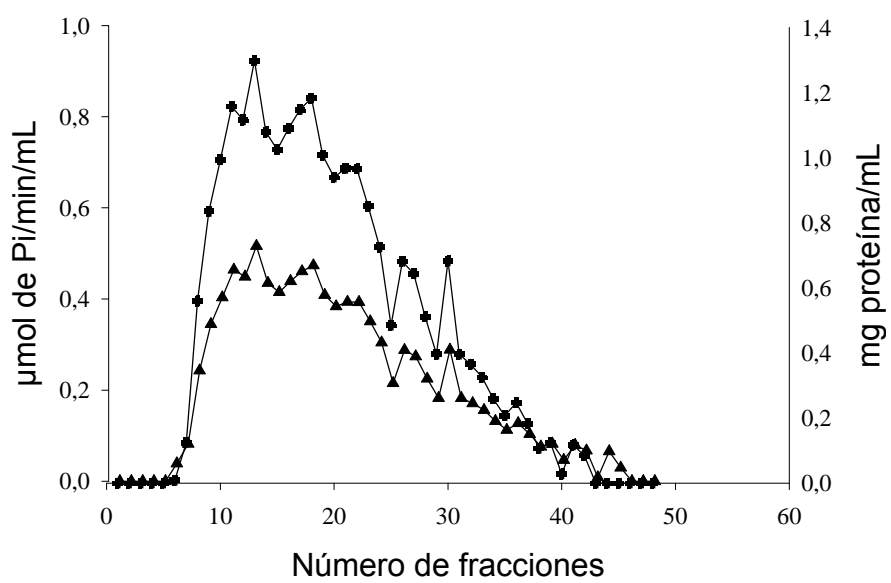


Figura 26. Cromatografía en concanavalina A. Elución con un α -D-manopiranososa 0.5 M. Proteína (●), actividad 5'-nucleotidasa (▲).

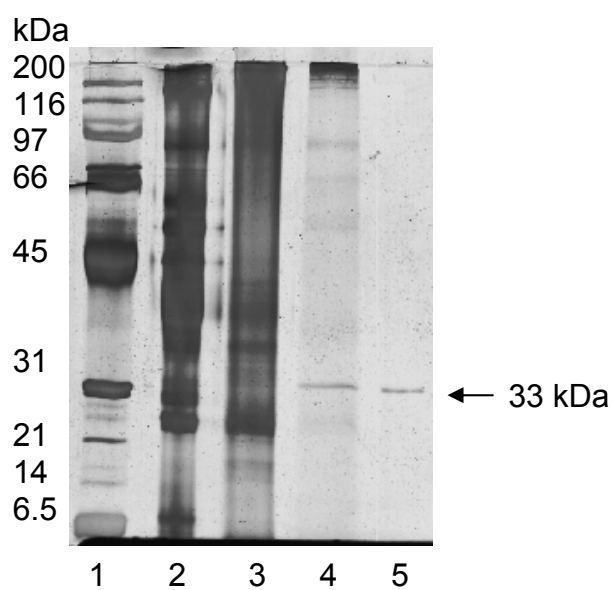


Figura 27. SDS-PAGE durante purificación de 5'-nucleotidasa. Gel de poliacrilamida al 14 %, las bandas fueron teñidas con nitrato de plata. Línea 1, estándar de amplio rango (biorad); línea 2, extracto crudo; línea 3, dializado; línea 4, cromatografía en concanavalina A; línea 5, cromatografía en 5'-AMP sefarosa.

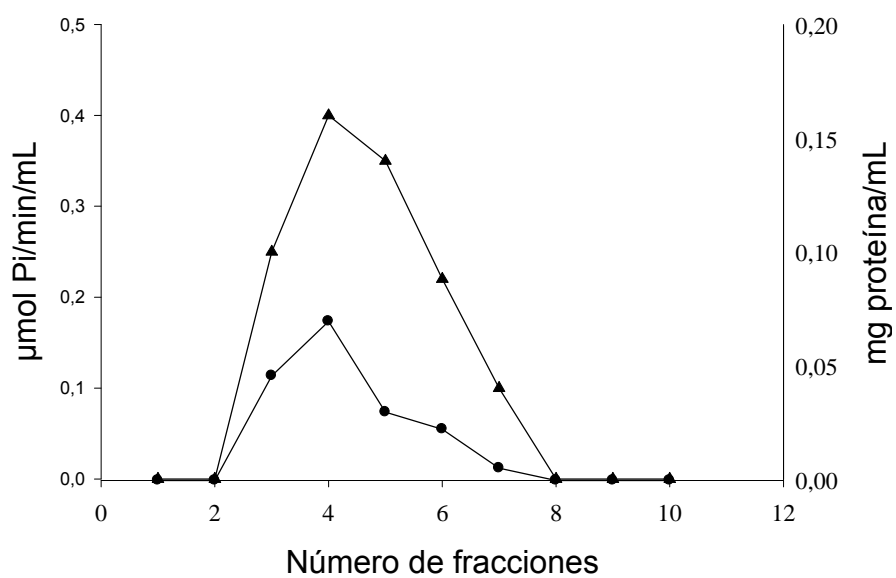


Figura 28. Cromatograf\u00eda en 5'-AMP sefarosa. Elusi\u00f3n con AMP 20 mM. Prote\u00edna (■), actividad 5'-nucleotidasa (▲).

inyectadas y un 12.9 % de rendimiento. La Figura 28 muestra el patrón de elusión de la enzima 5'-nucleotidasa en 5'-AMP sefarosa. Se obtuvo una actividad específica de 5.15 U/mg de proteína y un número de purificación de 953.7. El procedimiento cromatográfico en 5'-AMP sefarosa es uno de los más utilizados en etapas finales de purificación de esta enzima. Tkacz-Stachowska y col. (2005), purificaron la 5'-nucleotidasa de pechuga de paloma aumentando con esta técnica cromatográfica la actividad específica de 0.60 a 4.3 U/mg de proteína, el número de purificación de 18 a 131, para obtener un rendimiento final de 20.6 %.

Caracterización de 5'-nucleotidasa

SDS-PAGE y Filtración en Gel

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes con la finalidad de monitorear el proceso de purificación (Figura 27). Se observa la eficacia de la cromatografía en concanavalina A en el proceso de purificación al obtener un patrón de bandeo con pocas bandas. Asimismo se observó una buena cantidad de proteína de alto peso molecular (≥ 200 kDa). La cromatografía en 5'-AMP sefarosa brindó una sola banda de PM de 33 kDa. El pool resultante de esta cromatografía se sometió a filtración en gel para obtener el PM nativo, con lo que se obtuvo un valor de 107 kDa (Figura 29). Estos resultados sugieren que la 5'-nucleotidasa de manto de calamar es una enzima trimérica.

Los valores difieren de lo reportado en la literatura por varios autores y diferentes fuentes de esta enzima. Fini y col. (2003), trabajando con plasma de toro y corazón de perro, reportaron para el primer caso un trímero con PM nativo de 200 kDa y subunidades de 66 kDa; para el segundo, un tetrámero de 166 kDa con subunidades de 43 kDa. Por otro lado, Höglund y Reichard (1990) reportaron un PM nativo de 45 kDa con subunidades de

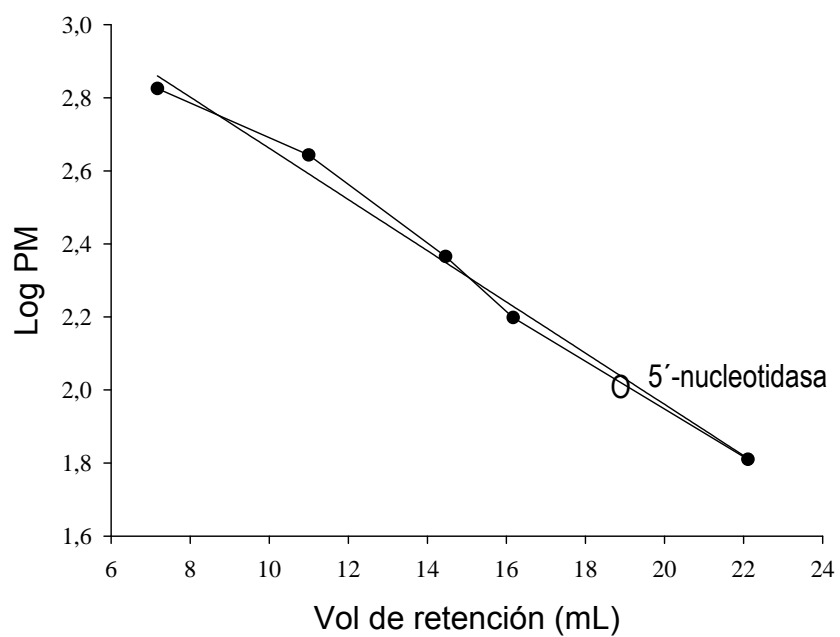


Figura 29. Estimación del peso molecular nativo de 5'-nucleotidasa en superdex 200. El logaritmo del peso molecular se graficó contra el volumen de elución. El pico de elución se determinó por densidad óptica (absorbancia a 280 nm) y por actividad 5'-nucleotidasa.

22 kDa, proponiendo una nucleotidasa homodimérica en placenta humana. Los resultados del presente estudio, conjuntamente con la información disponible, indican que la 5'-nucleotidasa es una enzima multimérica de variados pesos moleculares y subunidades, encontrándose esta como unhomodímero (Höglund y Reichard, 1990), heterodímero (Baillyes y col., 1984), trímero (Fini y col (2003) y tetrámero (Fini y col 2003; Spychala y col., 1999; Marseno y col., 1993b).

Punto Isoeléctrico

El isoelectroenfoque para la 5'-nucleotidasa mostró 2 bandas (Figura 30) que corresponden a pI de 3.6 y 3.8. Esto probablemente se deba a la existencia de isoformas de esta enzima, ya que la filtración en gel mostró un solo pico de proteína (Figura 29) y la SDS PAGE una sola banda (Figura 27), donde los cálculos correspondientes para su PM concuerdan entre si. Por otra parte, existe la posibilidad de que la enzima nativa al someterse a las condiciones de isoelectroenfoque se desnaturalice y se desdoble en sus subunidades, teniendo como consecuencia un pI para la forma nativa y otro para las subunidades.

Estos pI's en la zona ácida indican la predominancia de aminoácidos ácidos en relación a aquellos que confieren carga positiva. García y col. (1997) detectaron valores diferentes para 5'-nucleotidasa de E. Coli, donde reportan un pI de 4.6. En otro estudio, Fini y col. (2003) reportaron pI's de 6.58, 6.33, 6.19 y 6.07 para las isoformas 5'-NT-1, 5'-NT-2, 5'-NT-3 y 5'-NT-4, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, la 5'-nucleotidasa es una enzima de muy variado PM (en función de la especie) y por consecuencia de grandes variaciones en su estructura primaria. Lo anterior pudiera ocasionar igualmente diferencias en sus pI, explicando con ello las discrepancias de los resultados obtenidos en el presente estudio con aquellos reportados en la literatura.

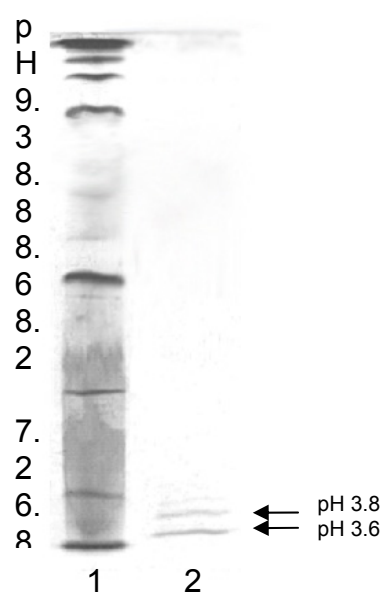


Figura 30. Isoeléctroenfoque en fast system de 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar gigante. Línea 1, estándar de 3.6 – 9.3 (sigma-aldrich); línea 2, 5'-nucleotidasa purificada.

Temperatura Óptima de Acción

La actividad de la 5'-nucleotidasa incrementó conforme aumentó la temperatura a 50 °C; a temperaturas superiores, la actividad decayó abruptamente, sugiriendo su inactivación térmica (Figura 31). Marseno y col. (1993a,b) determinaron para la 5'-nucleotidasa citosólica y la ecto 5'-nucleotidasa de pescado roca (*Sebastes inermis*) una temperatura óptima de acción de 46 °C y 47 °C respectivamente.

Estabilidad a la Temperatura

La termoestabilidad de esta enzima no ha sido estudiada en detalle, por lo que existe poca información al respecto. Los resultados del presente estudio indican que la enzima fue estable en el rango de 10-50 °C por un período de incubación de 30 min, manteniendo actividades remanentes entre 100 y 80 %; períodos superiores de incubación resultaron en un decremento pronunciado de su estabilidad cuando la temperatura excedió los 20 °C. La enzima fue muy inestable a temperaturas de incubación de 55 - 60 °C, con actividades remanentes de 8.1 y 1.6 % respectivamente a los 15 min (Figura 32). Resultados similares fueron reportados por Marseno y col. (1993a,b) para la ecto 5'-nucleotidasa y 5' nucleotidasa citosólica de pescado roca, con actividades remanentes de 90 y 80 %, respectivamente, después de 30 minutos de incubación a 40 °C y 35 °C.

pH Óptimo de Acción

El pH óptimo de acción detectado fue de 4.5 (Figura 33). Pocos estudios reportan pH's óptimos similares al obtenido en el presente estudio. Kuda y col. (2002) reportaron un pH óptimo de 5.0 para macarela (*Trachurus japonicus*), Echetebu (1980) reportó un óptimo de 5.2 para 5'-nucleotidasa de lagarto, mientras que Burger y Lowenstein (1970) un óptimo de 5.4 en

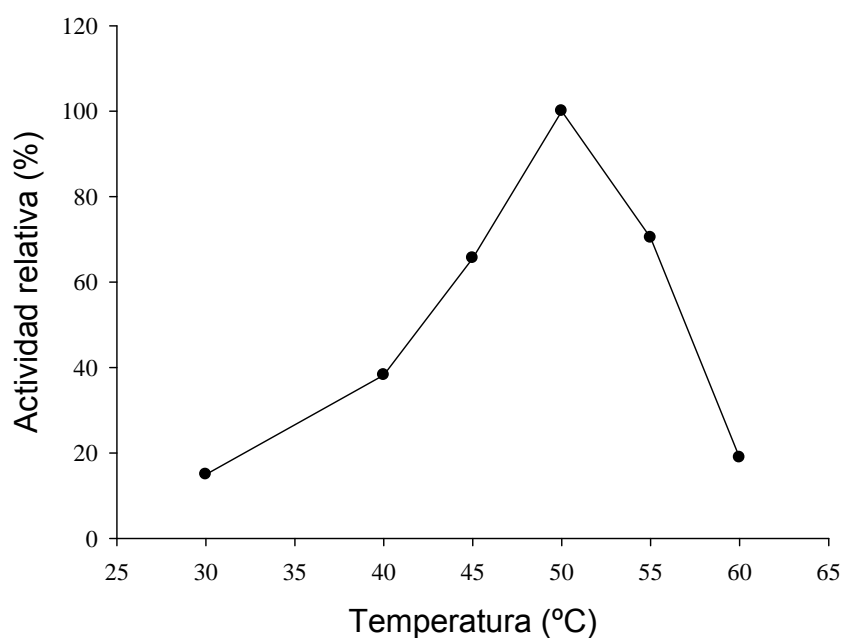


Figura 31. Temperatura óptima de acción de 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM y NaCl 200 mM.

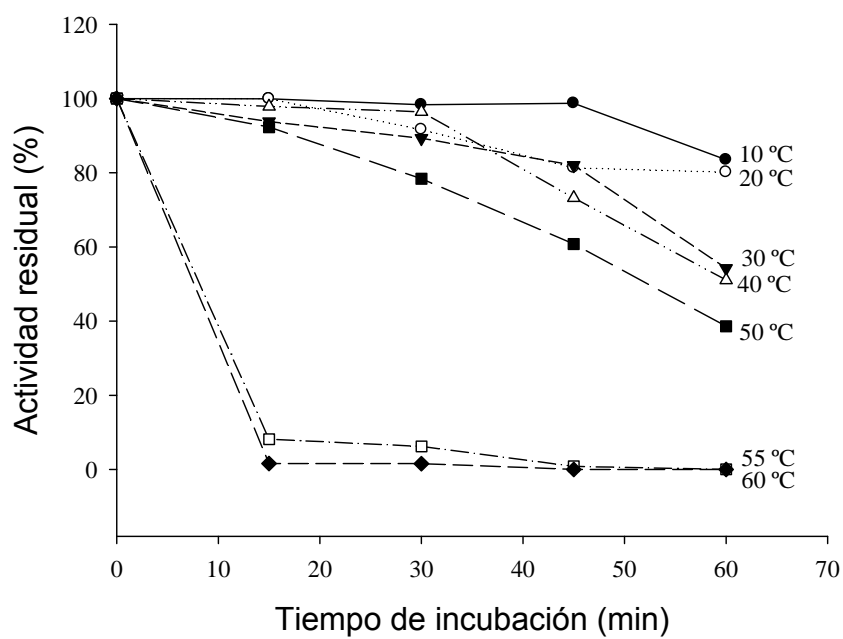


Figura 32. Estabilidad a la temperatura de 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 40 μL de extracto enzimático + 360 μL de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, MgCl_2 20 mM, CaCl_2 20 mM y NaCl 200 mM, 50 $^\circ\text{C}$.

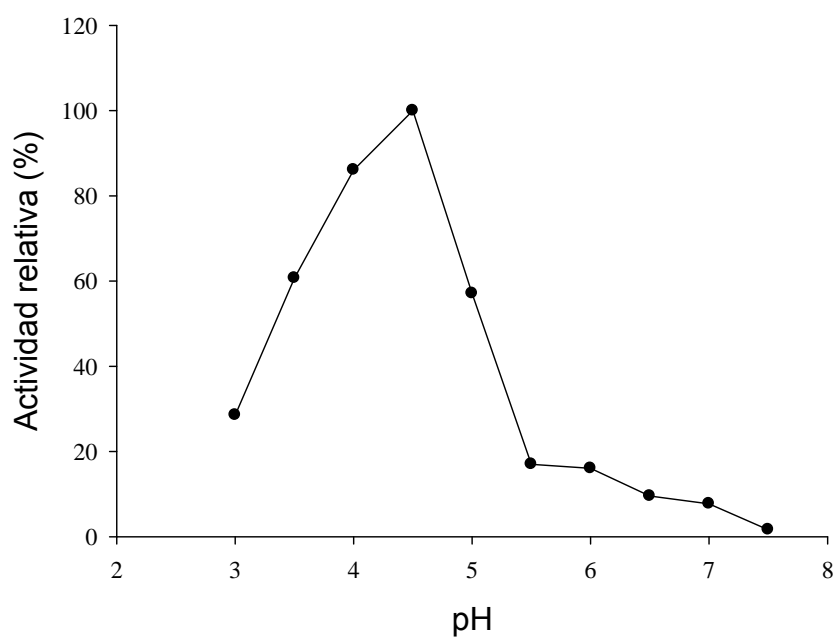


Figura 33. pH óptimo de acción de 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio o cacodilato de sodio a distintos pH's 40 mM, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM y NaCl 200 mM, 50 °C.

músculo liso de intestino delgado. Sin embargo, el pH obtenido fue bajo al compararlo con los óptimos reportados para otras fuentes de esta enzima; así por ejemplo, el pH óptimo para la 5'-nucleotidasa de pescado roca fue de 8.3 (Marseno y col., 1993b), para abadejo del pacífico de 7.6 (Tarr y col., 1969), para corazón humano de 7.0 (Skladanowski y col., 1996) y para corazón de perro de 7.5 (Darvish y Meeting, 1993). En la mayoría de las investigaciones sobre esta enzima el pH óptimo fluctúa entre 6 y 8.

Estabilidad al pH

La mayoría de las 5'-nucleotidasas presentan pH's óptimos entre 6 y 8, coincidentemente a estos pH presentan mayor estabilidad. La 5'-nucleotidasa purificada en nuestro estudio posee un pH óptimo de 4.5, y una mayor estabilidad en el rango de 3 a 5.

La enzima fue estable por 30 min en el rango de pH de 3 a 5, mientras que a pH 6, 7 y 8 se detectó una actividad remanente de 62, 46 y 28 %, respectivamente. Después de 60 min de incubación, la actividad remanente fue de 65, 60, 53, 70, 40, 45 y 29 % para los pH 3, 4, 4.5, 5, 6, 7 y 8, respectivamente (Figura 34). Resultados obtenidos por Marseno y col. (1993a) con pescado roca mostraron una buena estabilidad de esta enzima durante 30 min en el rango de pH de 7.0 a 9.0, mientras que a 6.0 su actividad residual decreció abruptamente a 8 %; la actividad remanente a pH menor de 6.0 fue nula.

Efecto del NaCl

El efecto del NaCl como fuente de catión monovalente sobre la actividad 5'-nucleotidasa se ha estudiado poco, investigándose en mayor grado el efecto de cationes divalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} . Este ión mostró un efecto positivo en la enzima aumentando a su actividad en un 130 % a una concentración de 400 mM (Figura 35). Skladanowski y

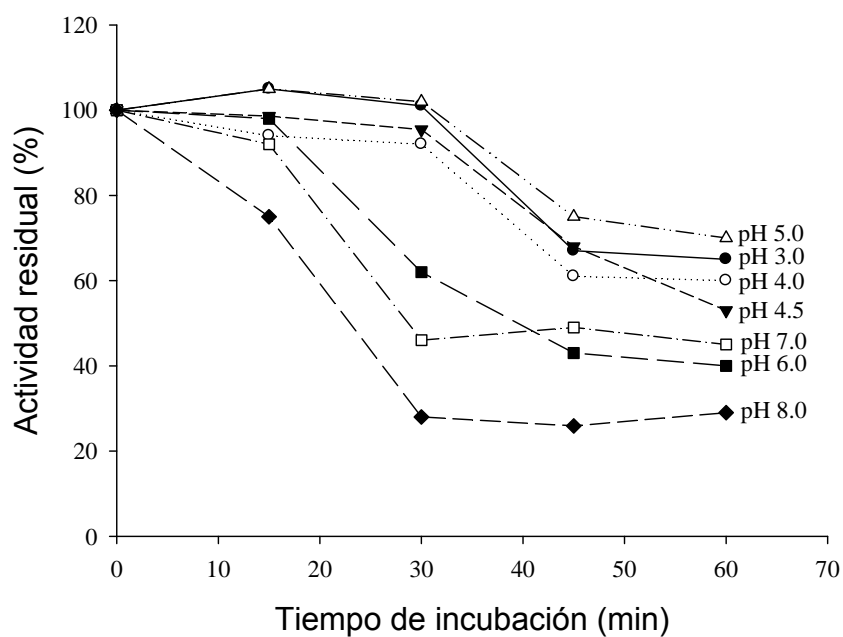


Figura 34. Estabilidad al pH de 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM y NaCl 200 mM, 50 °C.

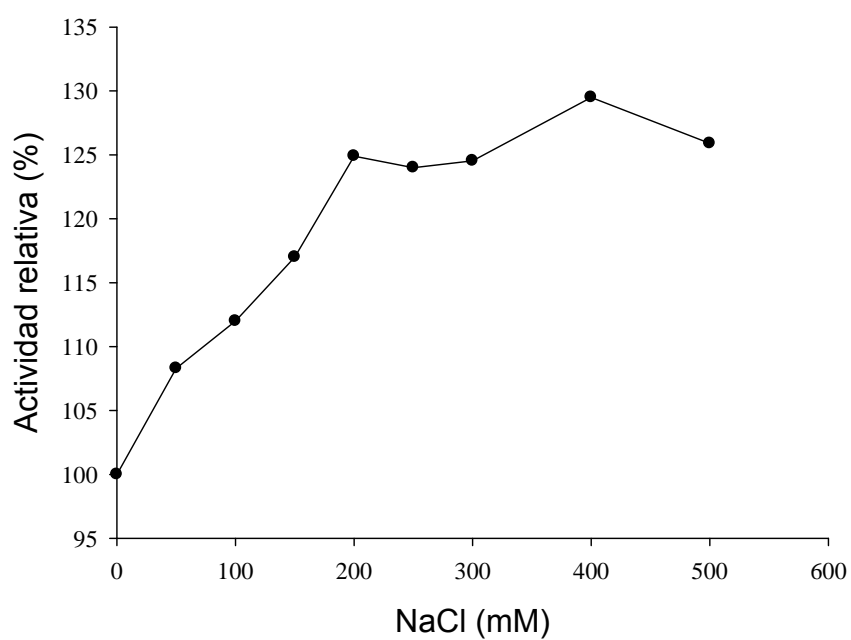


Figura 35. Efecto del NaCl sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar gigante. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM y NaCl de 0 a 500 mM, 50 $^{\circ}C$.

Newby (1990) observaron el efecto de este catión en enzima purificada de corazón de paloma observando un comportamiento bifásico activando a la 5'-nucleotidasa en el rango de 0 a 500 mM, con un pico máximo a 50 mM. En otro estudio, Willadsen y Riding (1989) detectaron un efecto inhibitorio de este catión en 5'-nucleotidasa aislada de *Boophilus microplus* reportando una actividad residual del 70 % en presencia de NaCl a 200 mM.

Efecto del MgCl₂

Esta sal mostró un efecto positivo en la actividad de la enzima aumentando su actividad a 165 % a una concentración de 18 mM (Figura 36). Una gran variedad de enzimas necesitan de cationes mono o divalentes para su actividad y esta es una de ellas. El efecto activador o inhibidor depende de la fuente de 5'-nucleotidasa, aunque por lo regular el MgCl₂ actúa como un activador. Resultados similares al del presente trabajo fueron reportados por Naito y Lowenstein (1981), quienes evaluaron el efecto de MgCl₂ en 5'-nucleotidasa de corazón de rata en un intervalo de concentración de 0 a 50 mM, obteniendo un máximo de actividad de 140 % a una concentración de 20 mM. Por otra parte, Marseno y col. (1993a) evaluaron el efecto de la misma sal (0 a 10 mM) en 5'-nucleotidasa purificada de pescado roca, obteniendo con 10 mM un aumento a 200 % en su actividad relativa. Nuestros resultados demuestran que la 5'-nucleotidasa de calamar gigante es activada preferentemente por MgCl₂ que por NaCl. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura.

Efecto del CaCl₂

Este catión divalente resultó tener un efecto activador menor sobre 5'-nucleotidasa en comparación con el MgCl₂, con un aumento su actividad relativa a 129 % a 20 mM (Figura 37). Resultados similares fueron reportados para 5'-nucleotidasa de pescado roca (Marseno y col., 1993a), en donde el Mg⁺² fue activador, mientras que el Ca⁺² no mostró efecto

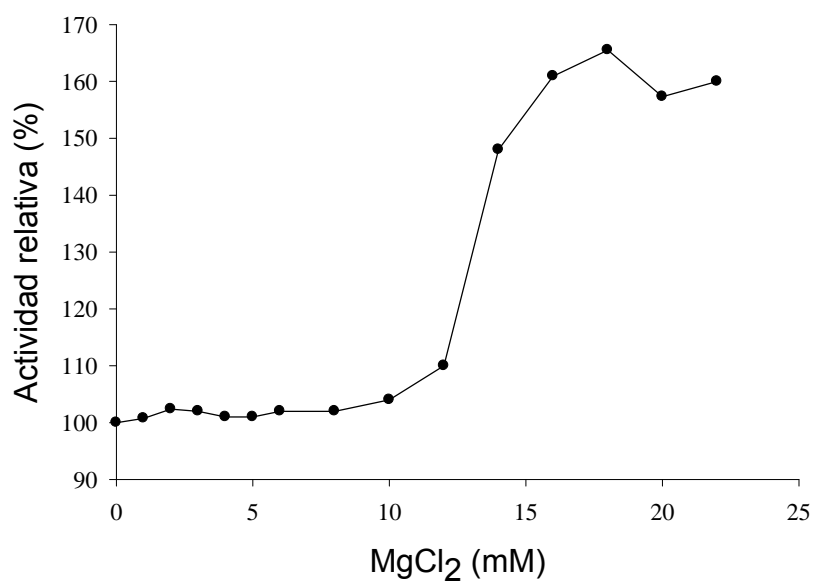


Figura 36. Efecto del MgCl₂ sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar gigante. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, NaCl 200 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ de 0 a 22 mM, 50 $^{\circ}$ C.

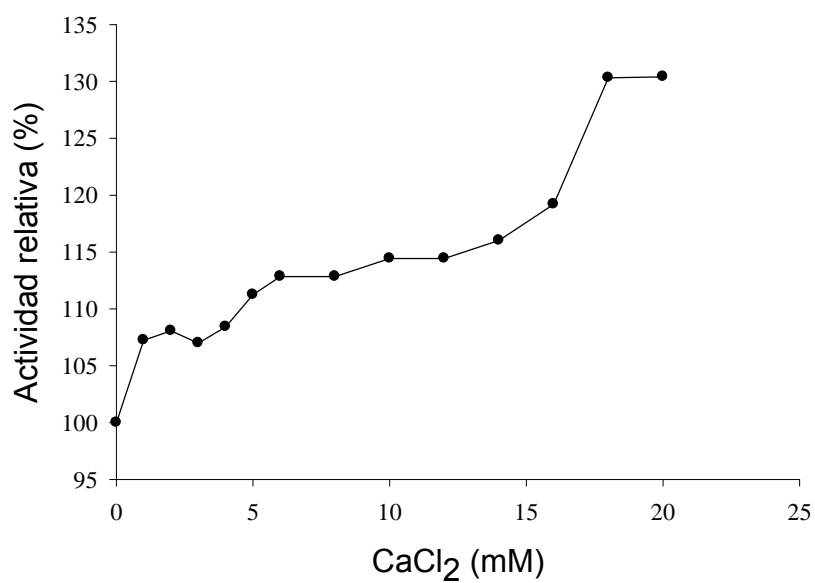


Figura 37. Efecto del CaCl₂ sobre la actividad AMP deaminasa purificada del manto de calamar gigante. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, NaCl 200 mM, MgCl₂ 20 mM y CaCl₂ de 0 a 20 mM, 50 °C.

activador ni inhibitorio. De igual forma, Darvish y Meeting (1993) evaluaron el efecto de estos cationes divalentes en 5'-nucleotidasa purificada de corazón de perro, para la cual $MgCl_2$ mostró un pico máximo de actividad a una concentración de 3.5 mM, mientras que el $CaCl_2$, al igual que en la enzima de pescado roca, no presentó efecto activador ni inhibidor. En raya eléctrica (*Torpedo marmorata*) ambos cationes presentaron un efecto activador muy similar cuando se evaluaron en el intervalo de 0 a 2 mM, aumentando la actividad relativa de la enzima a 135 % y 142 % por $CaCl_2$ y $MgCl_2$, respectivamente (Grondal y Zimmermann, 1987). Los resultados del presente estudio corroboran lo reportado para otras fuentes de 5-nucleotidasas.

Efecto del ATP

La enzima 5'-nucleotidasa es una enzima que juega un papel importante en la regulación de los niveles de AMP en músculo, en función del estado fisiológico del animal. Su regulación está sujeta a cationes mono y divalentes, análogos de AMP como ATP y ADP, así como a la carga energética adenilada (CEA). Esta última describe el estatus energético de un organismo en función de las concentraciones molares de ATP, ADP y AMP. Por consiguiente, los análogos de AMP tienen un fuerte impacto en la regulación de la enzima. El efecto del ATP sobre la actividad de la 5'-nucleotidasa se observa en la Figura 38, donde se aprecia un efecto activador relevante a bajas concentraciones de ATP. La actividad de la enzima aumentó de 0.09 U/mg de proteína a 0.18 U/mg de proteína, es decir, hubo un aumento del 100 %, posteriormente dicho efecto activador disminuye con un aumento en la concentración de ATP por arriba de 2 mM.

En la mayoría de los estudios en los que se ha evaluado el efecto del ATP sobre la actividad de la 5'-nucleotidasa, éste ha demostrado ser un activador. Skladanowski y col. (1990) evaluaron su efecto sobre 5'-nucleotidasa de músculo de rata en el rango de 0 a 1 mM, aumentando la

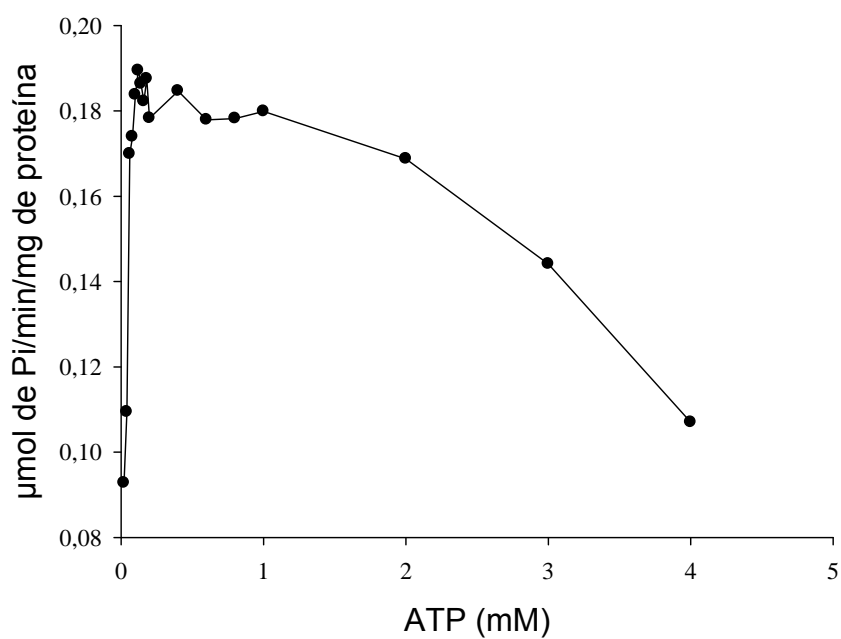


Figura 38. Efecto del ATP sobre la hidrólisis de AMP por 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM, NaCl 200 mM y ATP en el rango de 0 a 4 mM, 50 $^{\circ}C$.

actividad de 5 a 15 U/mL. La enzima 5'-nucleotidasa humana mostró un aumento en su actividad de 1 U/mg de proteína a 6 U/mg de proteína, en el rango de concentración de ATP de 0 a 2 mM (Hunsucker y col., 2001); sin embargo, cabe mencionar que el ATP puede actuar como inhibidor en otras fuentes de enzima según lo reportado por Orford y Saggerson (1996) e Ipata (1968).

Los resultados del presente estudio mostraron que el ATP es un metabolito clave que puede actuar como un buen activador en el rango de 0.02 a 2 mM. En este sentido, considerando que la concentración de ATP en calamar recién capturado fue de 6.54 $\mu\text{M/g}$ de músculo, lo cual correspondría a 8.17 mM, se asume que cuando el calamar está recién capturado no existen niveles adecuados de ATP para actuar como un efector positivo de la 5'-nucleotidasa. Sin embargo, después de 15 h de almacenamiento en hielo los niveles de ATP han disminuido drásticamente (8.17 mM a 1.81 mM), ocasionando con esto niveles adecuados que pudieran actuar como un efector positivo de la enzima.

Efecto del ADP

El efecto del ADP sobre 5'-nucleotidasa difirió en gran medida al observado para ATP. Concentraciones reducidas de ADP no presentó cambios aparentes en la actividad de la enzima; sin embargo, al aumentar su concentración a valores cercanos a 0.6 mM, la actividad aumentó drásticamente (Figura 39). Tkacz-Stachowska y col. (2005), al evaluar el efecto del ADP en la 5'-nucleotidasa citosólica de músculo de paloma, observaron un efecto activador al disminuir su K_m de 1.85 a 0.29 en la presencia de ADP 1 mM. Similarmente, la actividad 5'-nucleotidasa de humano se efecto positivamente en el rango de concentraciones de 0 a 2 mM, aumentando su actividad específica de 1 a 38 $\mu\text{M de Pi/min/mg de proteína}$ (Hunsucker y col., 2001). Por otro lado, Skladanowski y col. (1996) observaron para 5'-nucleotidasa de rata, una acción activadora del ADP en

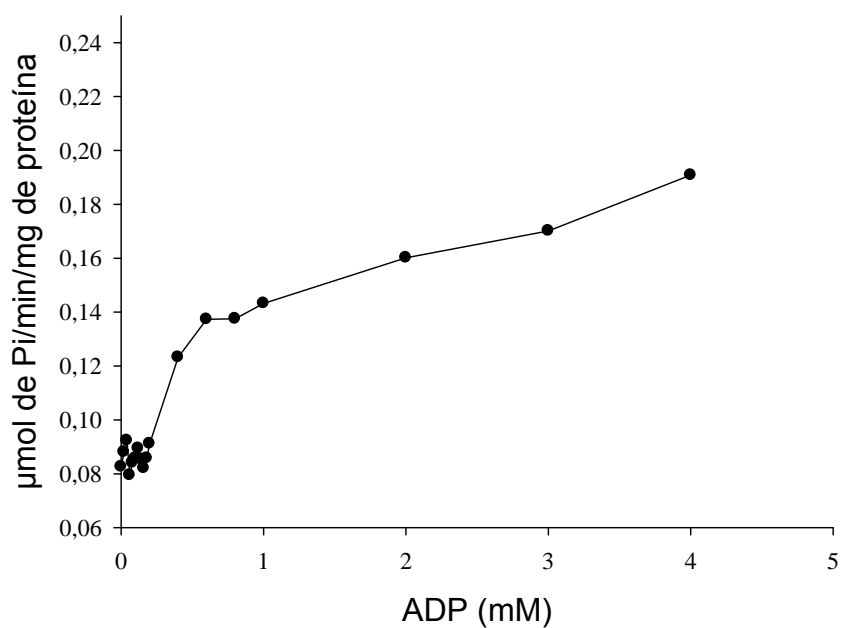


Figura 39. Efecto del ADP sobre la hidrólisis de AMP por 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Ensayo enzimático: 40 μ L de extracto enzimático + 360 μ L de AMP 10 mM en citrato de sodio 40 mM, pH 4.5, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM, NaCl 200 mM y ADP en el rango de 0 a 4 mM, 50 $^{\circ}C$.

el rango de 0 a 1 mM, en el cual su actividad específica incrementó de 0.1 a 0.3 U/mg. No obstante lo anterior, tanto ATP como ADP pueden actuar también como inhibidores dependiendo de la fuente de enzima en estudio (Orford y Saggerson, 1996).

La concentración molar de ADP en calamar recién capturado fue de 0.49 $\mu\text{M/g}$ de músculo, lo cual corresponde a 0.61 mM, asumiendo de esta manera que existen niveles adecuados de ADP para actuar como un efector positivo en 5'-nucleotidasa del manto de calamar gigante.

En el presente estudio, ATP y ADP actuaron como activadores; sin embargo, el primero fue sumamente eficiente a bajas concentraciones, mientras que el segundo lo fue a altas.

Cinética

Las velocidades iniciales en el rango de sustrato de 0 a 20 mM mostraron un comportamiento hiperbólico que obedece a una cinética Michaelis y Menten (Figura 40).

La enzima 5'-nucleotidasa de calamar gigante mostró una K_m de 1.49 mM, y una V_{max} de 0.29 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Estos datos indican una alta afinidad de la enzima por su sustrato en comparación con la enzima AMP deaminasa, sin embargo el valor del K_m obtenido en el presente estudio discrepa con lo reportado en la literatura para otras especies marinas, en donde Marseno y col. (1993b) estudiando la ecto 5'-nucleotidasa de pez roca (*Sebastes inermes*) reportaron un K_m de 21 μM ; en otro estudio Grondal y Zimmermann (1987), reportaron un valor de K_m de 38 μM para 5'-nucleotidasa de raya, mientras que Senger y col. (2004), detectaron una K_m de 135 μM para 5'-nucleotidasa de pez zebra (*Danio rerio*).

Los valores experimentales de K_{cat} y la relación K_{cat}/K_m en el presente estudio fueron de 0.5171 moles de $P_i \cdot s^{-1}$ y 356.62 $[(\text{mol/L})^{-1} s^{-1}]$, respectivamente. Resultados similares fueron reportados recientemente por Tracz-Stachowska y col. (2005), quienes aislaron y caracterizaron la 5'-nucleotidasa citosólica de músculo de pechuga de paloma reportando un

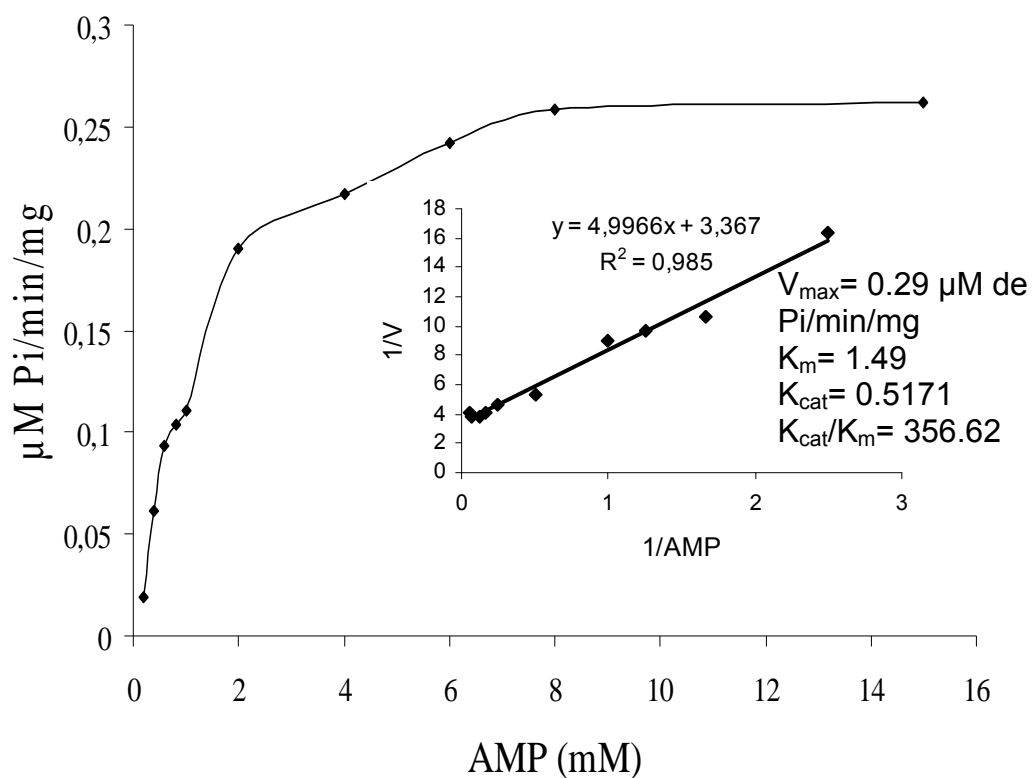


Figura 40. Efecto de la concentración de AMP sobre la actividad 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Concentraciones de AMP: 0.2 – 20 mM; concentración de enzima: 2 μg ; buffer: citrato de sodio 40 mM pH 4.5, MgCl_2 20 mM, CaCl_2 20 mM y NaCl 200 mM, 50 °C.

valor de K_{cat} de 0.1065 moles de $P_i \cdot s^{-1}$ y una eficiencia catalítica de 57 $[(mol/L)^{-1} s^{-1}]$. En otro estudio Hunsucker y col. (2001), trabajaron con 5'-nucleotidasa de humanos encontrando un valor de K_{cat} de 5.13 moles de $P_i \cdot s^{-1}$ y una eficiencia catalítica de 1734 $[(mol/L)^{-1} s^{-1}]$.

La degradación de ATP hasta Hx en el manto de calamar gigante enhielado ocurre en las primeras 24 h (Figura 7). En este lapso, los niveles de AMP fluctuaron entre 0.87 y 1.14 mM, es decir, en concentraciones en el orden del valor del K_m de la 5'-nucleotidasa. Lo anterior sugiere una mayor formación de adenosina en relación a la de IMP, ya que el K_m de la AMP deaminasa fue de 13 mM, considerando así una baja acción de esta última enzima a niveles muy bajos de sustrato como los que existen en el músculo posmortem durante las primeras 24 h.

Los resultados experimentales del presente estudio indicaron que las propiedades catalíticas de la 5'-nucleotidasa del manto de calamar son muy similares a las de invertebrados. Por otro lado, las propiedades de la AMP deaminasa difieren de la de otros organismos marinos. Sin embargo, en términos generales, tanto los resultados para AMP deaminasa como para 5'-nucleotidasa, coincidieron con lo reportado en la literatura, es decir, la degradación del AMP en el manto de calamar gigante se da en mayor proporción por la enzima 5'-nucleotidasa.

La enzima 5'-nucleotidasa se caracteriza por actuar sobre 5'-ribo y 5'-deoxinucleótidos. En el presente estudio se determinaron también las propiedades catalíticas de esta enzima utilizando IMP como sustrato. Los resultados indicaron que la enzima 5'-nucleotidasa de manto de calamar gigante actúa de forma más eficiente sobre AMP que sobre IMP; es decir, una acción nucleotidasa preferente sobre AMP como sustrato, lo cual es la herramienta fundamental para distinguir entre las nucleotidasas cN-I y cN-II (cN-II prefiere IMP como sustrato). La 5'-nucleotidasa de manto de calamar sobre IMP mostró una K_m de 6.34 mM, V_{max} de 0.19 $\mu M/min/mg$ de proteína y un K_{cat} de 0.3388 moles de $P_i \cdot s^{-1}$ (Figura 41).

La eficiencia catalítica es la herramienta ideal que ayuda a estimar o a comparar la eficiencia de una enzima sobre diferentes sustratos. Como se

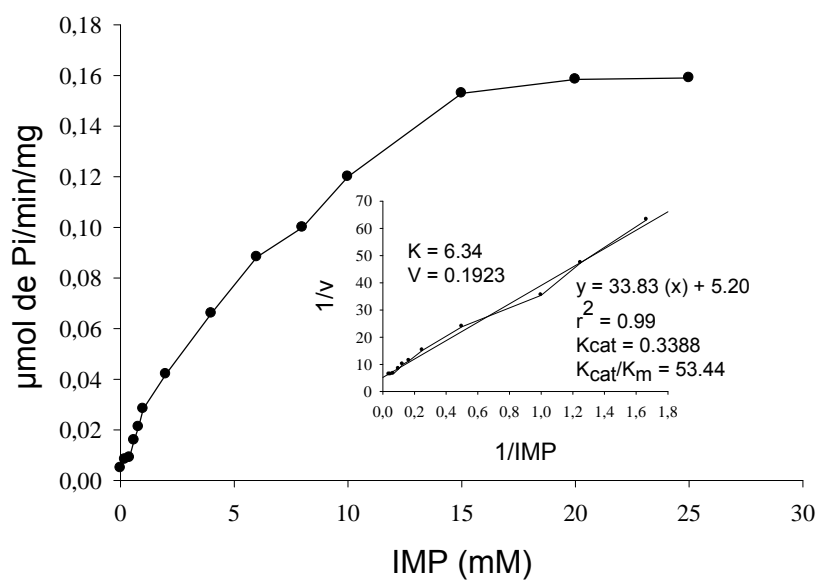


Figura 41. Efecto de la concentración de IMP sobre la actividad 5'-nucleotidasa purificada del manto de calamar. Concentraciones de IMP: 0.2 – 25 mM; concentración de enzima: 2 μ g; buffer: citrato de sodio 40 mM pH 4.5, $MgCl_2$ 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM y NaCl 200 mM, 50 $^{\circ}C$.

menciono anteriormente, la eficiencia catalítica de esta enzima utilizando AMP como sustrato fue de 356.62 [(mol/L)⁻¹s⁻¹], mientras que sobre IMP de 53.44, siendo 6.7 veces mayor la eficiencia sobre AMP, por lo que de esta forma se demuestra que la nucleotidasa aislada en el presente estudio es aquella que prefiere AMP como sustrato, es decir, una cN-I.

CONCLUSIONES

La degradación del ATP en el manto de calamar gigante sigue un patrón característico muy diferente al presentado en otros organismos marinos, por consiguiente el valor K como índice de frescura no aplica en esta especie para monitorear su calidad durante el almacenamiento en hielo. Dicho índice se comporta de manera lineal solo en las primeras 24 h posmortem al igual que la acumulación de Hx, caracterizándose esta especie como formadora de Hx según la clasificación descrita por Ehira y Uchiyama (1987).

La explicación a este fenómeno está ligado al estudio de las enzimas responsables de la degradación de estos metabolitos a partir de AMP hasta Hx, debido a que la degradación de ATP hasta AMP es sumamente rápido en todas las especies estudiadas, 2 de esas enzimas implicadas son AMP deaminasa y 5'-nucleotidasa. La segunda resultó ser 1.33 veces más eficiente, lo cual indica que 5'-nucleotidasa es una enzima con mayor afinidad sobre AMP que AMP deaminasa; sin embargo, una característica sobresaliente de AMP deaminasa es su alto valor de K_m en relación a aquel de 5'-nucleotidasa, lo cual pone en seria desventaja catalítica a AMP deaminasa frente a 5'-nucleotidasa a pesar de poseer eficiencias catalíticas un tanto semejantes. Cabe mencionar que estas diferencias en sus propiedades catalíticas eran las esperadas debido a que en la mayoría de los invertebrados estudiados predomina la defosforilación de AMP, más que la deaminación.

Por otra parte los niveles de ATP y ADP en el manto de calamar actúan como efectores positivos en ambas enzimas ayudando con esto a una rápida degradación del AMP en el manto, aunado a esto las condiciones de manejo en la pesca artesanal del calamar gigante parecen crear condiciones favorables de temperatura y pH en el músculo para la acción de ambas enzimas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anuario Estadístico de Pesca, 2005. Comisión nacional de acuicultura y pesca. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación.
- Allegrini, S., Scaloni A., Ferrara L., Pesi R., Pinna P., Sgarrella F., Camiri M., Ericsson S. y Tosí MG. 2001. Bovine cytosolic 5-nucleotidase acts through the formation of an aspartate 52-phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 276:33526–33532.
- Ashby B. y Holmsen H. 1981. Platelet AMP deaminase. Purification and kinetic studies. *J. Biol. Chem.* 256: 10519-10523.
- Ashby B. y Frieden C. 1978. Adenylate deaminase. Kinetic and binding studies on the rabbit muscle enzyme. *J. Biol. Chem.* 253: 8728-8735.
- Baillyes, EM., Soos M., Jackson P., Newby AC., Siddle K. y Luzio JP. 1984. The existence and properties of two dimers of rat liver ecto-5'-nucleotidase. *Biochem. J.* 221:369-377.
- Boosman, A. y Chilson OP. 1976. Subunit Structure of AMP-deaminase from chicken and rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 251: 1847-1852.
- Bradford M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Burger, RM. y Lowenstein JM. 1970. Preparation and properties of 5'-nucleotidase from smooth muscle of small intestine. *J. Biol. Chem.* 245:6274-6280.
- Cheuk, WL., Finne F. y Nickelson R. 1979. Stability of adenosine deaminase and adenosine monophosphate deaminase during ice storage of pink and brown shrimp from the Gulf of Mexico. *J. Food Sci.* 44:1625-1628.
- Coffee, CJ. y Solano C. 1977. Rat muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase. Role of K^+ and adenylate energy charge in expression of kinetic and regulatory properties. *J. Biol. Chem.* 252:1606-1616.
- Copeland RA. 2000. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism and data analysis.* 2^{da} Ed. Wiley-VCH. New York. p.188-265.
- Copeland RA. 1994. *Methods for protein analysis.* Chapman & Hall. New York, N. Y. p.39-58.
- Cox, D y Karahadian C. 1980. Evaluation of microbial counts, nucleotide degradation and sensory attributes of cultured and wild yellow perch (*Perca flavescens*) during refrigerated storage. *J. Aq. Food Prod. Technol.* 7(1):5-26.
- Darvish, A. y Metting PJ. 1993. Purification and regulation of an AMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase from dog heart. *Am. J. Physiol.* 264:1528-1534.
- Davuluri, SP., Hird FJR. y Stanley IJ. 1981. On the significance of adenylic acid aminohydrolase in skeletal muscle of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B:369-375.

- De la Rosa, M., Silvia JT., García-Tirado VM. y García-Peña S. 1992. El Calamar una Pesquería en Desarrollo. CRIP Ensenada. Informe técnico del Instituto Nacional de la Pesca.
- Dutka, P., Szydłowska M., Chodorowski A., Rybakowska I., Ángel-Starczynowaka G. y Kaleta K. 2004. AMP-deaminase from normal and cirrhotic human liver: A comparative study. *Mol. Cel. Biochem.*19(7): 1-8.
- Echetebeu, CO. 1980. Intestinal 5'-nucleotidase of the *Lizard agama agama*. *Comp. Biochem. Physiol.* 67: 345-349.
- Ehira, S. y Uchiyama, H. 1987. Determination of fish freshness using the K value and comments on some other biochemical changes in relation to freshness. Proceedings of an international symposium coordinated by the University of Alaska. Elsevier Science Publisher B.V. Netherlands.
- Ehrhardt, NM., Jacquemin PS., Solis-Nava A., Garcia-Badillo F., González-Dávila G., Ortíz-Cobos J. y Ulloa-Ramírez. 1982. Crecimiento del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. *Ciencia Pesquera.* 3:41-60.
- Eskin, NAM., Henderson HH. y Townsend RJ. 1971. *Biochemistry of foods*. Academic Press, INC. New York.
- Fennema, OR. 1996. *Food Chemistry*. 3rd. ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Finni, C., Talamo F., Cherri S., Coli M., Floridi A., Ferrara L. y Scaloni A. 2003. Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *Biochem. J.* 372:443-451.
- Fiske, CH. y Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66:375-400.
- Fujisawa, K. y Yoshino M. 1987. Activities of adenylate-degrading enzymes in muscle from vertebrates and invertebrates. *Com. Biochem. Physiol.* 86: 109-112.
- Garcia, L., Chayet L., Kettlun AM., Collados L., Chiong M. Traverso-Cori A., Mancilla M. y Valenzuela MA. 1997. Kinetic characteristics of nucleoside mono-, di- and triphosphatase activities of the periplasmic 5'-nucleotidase of *Escherichia coli*. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B:135-142.
- Gazziola, C., Ferraro P., Moras M., Reichard P. y Bianchi V. 2001. Cytosolic high K_m 5'-nucleotidase and 5'(3')-deoxyribonucleotidase in substrate cycles involved in nucleotide metabolism. *J. Biol. Chem.* 276:6185-6190.
- Greene, D. H., Babbitt J. K. y Reppond K.D. 1990. Patterns of Nucleotide Catabolism as Freshness Indicators in Flatfish from Gulf of Alaska. *J. Food Sci.* 55:1236-1238.
- Grondal, EJM. y Zimmermann. 1987. Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from torpedo electric organ. *Biochem. J.* 245:805-810.
- Haard, NF. 1995. Foods as cellular systems: Impact on quality and preservation. A review. *J. Food Biochem.* 19:191-238

- Haas, AM. y Sabina RL. 2003. Expresión, purificación and inhibition of in vitro proteolysis of human AMPD2 (isoform L) recombinant enzymes. Protein expression and purification. 27: 293-303.
- Hattula, T., Kiesvaara, M y Moran, M. 1993. Freshness evaluation in european whitefish (*Coregonus wartmanni*) during chill storage. J. Food Sci. 58:1212-1215.
- Hellsten, Y., Richter EA., Kiens B. y Bangsho J. 1999. AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after exercise. J. Physiol. 520: 909-920.
- Hernández-Herrera, A., Morales-Bojorquez E., Cisneros-Mata MA., Nevárez-Martínez MO, y Rivera-Parra GI. 1998. Management strategy for the giant squid (*Dosidicus gigas*) fishery in the Gulf of California, Mexico. Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep 39:212-218.
- Hiltz, D.F., Bishop, L.J. y Dyer, W.J. 1974. Accelerated Nucleotide Degradation and Glycolysis During Warming to and Subsequent Storage at -5°C of Prerigor Quick-frozen Adductor Muscle of the Sea Scallop (*Placopecten magellanicus*). J. Fish Res. Bd. Can. 31:1181-1187.
- Hiltz, DF. y Dyer WJ. 1971. Octopine in postmortem adductor muscle of the sea scallop (*Placopecten magellanicus*). J. Fish. Res. Bd. Can. 28:869-874.
- Hisatome, I., Morisaki T., Kamma H., Sugama T., Morisaki H., Ohtahara A. y Colmes EW. 1998. Control of AMP deaminase. Am. J. Physiol. 275: 870-881.
- Höglund, L. y Reichard P. 1990. Cytoplasmic 5'(3')-nucleotidase from human placenta. J. Biol. Chem. 265:6589-6595.
- Howgate, P. 2005. A review of the kinetics of degradation of inosine monophosphate in some species of fish during chilled storage. Int. J. Food Sci Technol. 40:1-13.
- Hunsucker, SA., Spychala J. y Mitchell BS. 2001. Human cytosolic 5'-nucleotidase I. Characterization and role in nucleoside analog resistance. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 276: 10498-10504.
- Huss, HH. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO. Fisheries Technical Paper. 348. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. Italy.
- Ipata, PL. 1968. Sheep brain 5'-nucleotidase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleoside triphosphates. Biochem. Vol. 7 (2):507-515.
- Itoh, R. y Kimura K. 2002. Occurrence of IMP-GMP 5'-nucleotidase in three fish species: a comparative study on *Trachurus japonicus*, *Oncorhynchus masou masou* and *Triakis scyllium*. Comp. Biochem. Physiol. 132: 401-408.
- Iwamoto, M., Yamanaka H., Abe I., Ushio H., Watabe S. y Hashimoto K. 1988. ATP and creatine phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. J. Food Sci. 53:1662-1665.

- Izem, L., Raffin JP. y Thébault M. 1993. Elasmobranch fish (*Scyliorhinus canicula* and *Raja clavata*) muscle AMP deaminase: substrate specificity and effect of EDTA and adenylate energy charge. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B:383-386
- Kaletha, K. y Nowak G. 1988. Developmental forms of human skeletal-muscle AMP deaminase. The kinetic and regulatory properties of the enzyme. *Biochem. J.* 249:255-261.
- Kaminishi, Y., Nakaniwa, KI., Kunimoto M., y Miki H. 2000. Determination of K-value using freshness testing paper and freshness prediction of the finfishes stored at some different temperatures by the kinetic parameters. *Fish. Sci.*, 66:161-165
- Kuda, T., Matsumoto C. y Yano T. 2002. Changes in acid and alkaline phosphatase activities during the spoilage of raw muscle from horse mackerel *Trachurus japonicus* and gurnard *Lepidotrigla microptera*. *Food Chem.* 76:443-447.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
- Leray C., Raffin JP. y Winninger C. 1979. Aspect of purine metabolism in the gill epithelium of rainbow trout, *Salmo gairdneri richarson*. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B::31-40.
- Lushchak, VI., Smirnova YD. y Storey KB. 1998. AMP-deaminase from sea scorpion white muscle: properties and redistribution under hypoxia. *Comp. Biochem Physiol.* 119:611-618.
- Mahnke-Zizelman DK. y Sabina RL. 2002. N-Terminal sequence and distal histidine residues are responsible for pH-regulated cytoplasmic membrane binding of human AMP deaminase isoform E. *J. Biol. Chem.* 277:42654-42662.
- Mahnke-Zizelman, DK., Tullson PC. y Sabina RL. 1998. Novel aspects of tetramer assembly and N-terminal domain structure and function are revealed by recombinant expression of human AMP deaminase isoforms. *J. Biol. Chem.* 273:35118-35125.
- Mathews, CK. y Van Holde KE. 1998. *Bioquímica*. 2^{da} edición. Ed. McGraw-Hill.
- Marseno, DW., Hori K. y Miyazawa K. 1993a. Purification and properties of membrane-bound 5'-nucleotidase from black rockfish (*Sebastes inermis*) muscle. *J. Agric. Food Chem.* 41:863-869.
- Marseno, DW., Hori K. y Miyazawa K. 1993b. Purification and properties of cytosol 5'-nucleotidase from black rockfish (*Sebastes inermis*) muscle. *J. Agric. Food Chem.* 41:1208-1212.
- Martini, A., Ranieri-Raggi M., Antonietta RM. y Raggi SA. 2001. Regulation of skeletal muscle AMP deaminase: lysine residues are critical for the pH-dependent positive homotropic cooperativity behaviour of the rabbit enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1544:123-132

- McMillen, L., Beacham IR. y Burns DM. 2003. Cobalt activation of Escherichia coli 5'-nucleotidase is due to zinc ion displacement at only one of two metal-ion-binding sites. *Biochem. J.* 372:625-630.
- Merkler, DJ., Wali AS., Taylor J. y Schramm VL. 1989. AMP deaminase from yeas. Role in AMP degradation, large scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme. *J. Biol. Chem.* 264:2142-21430.
- Morán, PEF. 2002. Comportamiento bioquímico posmortem del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en hielo y su relación con parámetros de calidad. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora México.
- Mosharov, EV., Vitvitsky VM. y Ataulakhanov. 1998. Product activation of human erythrocyte AMP deaminase. *F. E. B. S. Letters.* 440:64-66.
- Murata, M y Sakaguchi M. 1986. Storage of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) white and dark muscles in ice: changes in content of adenine nucleotides and related compounds. *J. Food Sci.* 51:321-326.
- Naito, Y. y Lowenstein M. 1981. 5'-nucleotidase from rat heart. *Biochemistry.* 20:5188-5194.
- Nakamura, K., Ishikawa S., Kimoto K y Mizuno Y. 1985. Changes in freshness of japaneses common squid during cold storage. *Bull, Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 11 8:45.
- Nevárez-Martínez, MO., Hernández-Herrera A., Morales-Bojórquez E., Balmori-Ramírez A., Cisneros-Mata MA. y Morales-Azpeita R. 2000. Biomass and distribution of the jumbo squid (*Dosidicus gigas*: d'Orbigny, 1835) in the Gulf of California México. *Fisheries Research.* 49:129-140.
- Nigmatulli, ChM., Nesis KN. y Arkhipkin AI. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research.* 54:9-19.
- Norman, B., Sabina RL. y Jansson E. 2001. Regulation of skeletal muscle ATP catabolism by AMPD1 genotype during spring exercise in asymptomatic subjects. *J. Appl. Physiol.* 91: 258-264.
- Norman, B., Mahnke-Zizelman DL., Vallis A. y Sabina RL. 1998. Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 85:1273-1278.
- Ohashi, E., Okamoto M., Ozawa A. y Fijuta T. 1991. Characterization of common squid using several freshness indicators. *J. Food Sci.* 56 (1):161-174.
- Ogasawara, NH. Goto y Yamada Y. 1983. AMP deaminase isozymes in rabbit red and white muscles and Herat. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B:471-473.
- Orford, MR. y Saggerson D. 1996. A low- K_m 5'-nucleotidase from rat brain cytosolic fraction: purification, kinetic properties, and description of regulation by a novel factor that increase sensitivity to inhibition by ATP and ADP. *J. Neurochem.* 67:795-804.

- Pérez, SLA. 1985. Higiene y control de los productos de la pesca. Editorial Continental S.A. de C.V. México, D.F.
- Picher, M., Burch LH., Hirsh AJ. Spychala J. y Boucher RC. 2003. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hidrolizn ectoenzimas with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.* 278:13468-13479.
- Price, R. J., Melvin E. F. y Bell J. W. 1991. Postmortem Changes in Chilled Round, Bled and Dressed Albacore. *J. Food Sci.* 56:318-321.
- Raffin, JP. y Leray C. 1979. AMP Deaminase in the gill of trout (*Salmo Gairdneri R.*). Modalities of an activation by cellular proteolytic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B. 23-29
- Rampazzo, C., Gazziola C., Ferraro P., Gallinero L., Johansson M., Reichard P. y Bianchi V. 1999. Human high- K_m 5'-nucleotidase. Effects of overexpression of the cloned cDNA in cultured human cells. *Eur. J. Biochem.* 261: 689-697
- Ranieri-Raggi, M., Martini D., Sabbatini ARM., Moir AJG. y Raggi A. 2003. Isolation by zinc-affinity chromatography of the histidine-proline-rich-glycoprotein molecula associated with rabbit skeletal muscle AMP deaminase. Evidence that the formation of protein-protein complex between the catalytic subunit and the novel component is critical for the stability of the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1645:81-88.
- Ranieri-Raggi, M., Montaly U. Ronca F. Sabbatini A. Brown P.E. Moir A.J.G. y Raggi A. 1997. Association of purified skeletal-muscle AMP deaminase with a histidine-proline-rich-glycoprotein-like molecule. *Biochem. J.* 326:641-648.
- Rundell, KW., Tullson PC. y Terjung RL. 1992. AMP Deaminase binding in contracting rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 263: 287-293.
- Rush, JWE., Tullson PC. y Terjung RL. 1998. Molecular and kinetic alterations of muscle AMP deaminase during chronic creatine depletion. *Am. J. Physiol.* 43:465-471.
- Ryder, JM. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 33:678-680.
- Sabina, RL. y Mahnke-Zizelman DK. 2000. Towarda an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms. *Pharmacology & Therapeutics.* 87: 279-283.
- Saito, T., Arai K. y Matsuyoshi M. 1959. A New Method for stimating the freshness of fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 24, 749.
- Sala-Newby, GB., Nicola VE., Freeman NVE., Skladanowski AC. y Newby AC. 2000. Distinct roles for recombinant cytosolic 5'-nucleotidase-I and -II in AMP and IMP catabolism in COS-7 and H9c2 rat myoblast cell lines. *J. Biol. Chem.* 275:11666-11671.
- Segedhal, A., Busalmen JP., Roldan HA., Paredi ME. y Crupkin M. 1997. Post-mortem changes in adenosine triphosphate and related compounds in mantle of squid (*Illex*

- argentinus*) at different stages of sexual maturation. J. Aq. Food Product Technol. 64:43-55.
- Senger, MR, Pacheco E. Dutra R. Reis M. y Bonan CD. 2004. Ecto-5' -Nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. 139B: 203.207.
- Shirai, T., Kikuchi N., Matsuo S., Uchida S., Inada H., Suzuki T. y Hirano T. 1997. Taste of boreo pacific gonate squid gonatopsis boreales. Fish. Sci. 63:772-778.
- Sigholt, T., Erickson U., Rustad T., Johansen S., Nordtvedt T.S. y Seland A. 1997. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*salmo salar*). J. Food Sci. 62:898-904
- Sikorski, ZE. 1990. Seafood: Resources, nutritional composition and preservation. CRC. Florida.
- Sikorski, ZE. and Karnicki Z. 1990. Resources and their availability. Cap. 2. In "Seafood: Resources, nutritional composition and preservation". CRC Pres. 9-27.
- Skladanowski, AC., Hoffmann C., Krass J., Jastorff B. y Makarewicz W. 1996. Structure-activity relationship of cytoplasmic 5'-nucleotidase sites. Biochem. J. 314: 1001-1007.
- Skladanowski, AC., Smolenski RT., Tavenier M., De Jong JW., Yacoub MH. y Seymour AML. 1996. Soluble forms of 5'-nucleotidase in rat and human heart. Am. J. Physiol. 270:1493-1500.
- Skladanowski, AC. y Newby AC. 1990. Partial purification and properties of an AMP-Specific soluble 5'-nucleotidase from pigeon heart. Biochem. J. Vol. 268: 117-122.
- Smiley, KL., Berry AJ. y Suelter CH. 1967. An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. J. Biol. Chem. 242:2502-2506.
- Spychala, J., Chen V., Oka J. y Mitchell BS. 1999. ATP and phosphate reciprocally affect subunit association of human recombinant high K_m 5'-nucleotidase role for the C-terminal polyglutamic acid tract in subunit association and catalytic activity. Eur. J. Biochem. 259:851-858.
- Spychala, J., Kaletha K. y Makarewicz W. 1985. Developmental changes of chicken liver AMP deaminase. Biochem. J. 231: 329-333.
- Stankiewicz, A. y Spychala J. 1981. Comparative studies on AMP-deaminase-IV. Amino acid composition of the enzymes from rat, rabbit, hen, frog, pikeperch skeletal muscle and frog liver. Comp. Biochem. Physiol. 69B:5-8.
- Stankiewicz, A. 1982. Comparative studies on AMP-deaminase VII. Purification and some properties of the enzyme from crayfish *Orconectes Limosus* tail muscle. Comp. Biochem. Physiol. 72: 127-132.

- Stankiewicz, A., Spychala J., Skladanowski AC. y Zydowo M. 1979. Comparative studies on muscle AMP-deaminase-I. Purification, molecular weight, subunit structure and metal content of the enzymes from rat, rabbit, hen, frog and pikeperch. *Comp. Biochem. Physiol.* 62B:363-369.
- Suda, A. 1973. Development of fisheries for no conventional species. *J Fish Res. Bd. Can.* 30:2121-2158.
- Swieca, A., Rybakowska I., Koryziak A., Klimek J. y Kaletha K. 2004. AMP-deaminase from hen stomach smooth muscle-physico-chemical properties of the enzyme. *Acta Biochimica Polonica.* 51:213-218.
- Takkar, J.K., Janero D.R., Yarwod C., Sharif H. y Hreniuk D. 1993. Isolation and characterization of AMP deaminase from mammalian (rabbit) myocardium. *Biochem J.* 290:335-341.
- Taar, HLA., Gardner LJ. y Ingram P. 1969. Pacific cod muscle 5'-nucleotidase. *J. Food Sci.* 34:637-640.
- Tkacz-Stachowska, K., Lechward K. y Skladanowski AC. 2005. Isolation and characterization of pigeon breast muscle cytosolic 5'-nucleotidase-I (cN-I). *Acta Biochimica Polonica.* 52:789-796.
- Tomioka, K. y Endo K. 1984. K-Value increasing rate and IMP degrading activities in various fish muscle. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50: 889-892.
- Wang, D., Tang J., Correia LR. y Gill TA. 1998. Postmortem changes of cultivated atlantic salmon and their effects on salt Uptake. *J. Food Sci.* 63:634-637.
- Watabe, S., Kamal M. y Hashimoto K. 1991. Postmortem changes in ATP creatine phosphate, and lactate in sardine muscle. *J. Food Sci.* 56:151-153.
- Westermeier, R., Fichmann J., Gronau S., Schickle H., Theßeling G. y Wiesner P. 1997. *Electrophoresis in practice.* 2nd Edición. VCH a Wiley Company.
- Whitaker, JR. 1994. *Principles of enzymology for food sciences.* 2nd. Ed. Marcel Dekker Inc. New York. P. 63-115
- Willadsen, P., Nielsen JM. y Riding GA. 1989. Purification and properties of a novel nucleotide-hydrolysing enzyme (5'-nucleotidase) from *Boophilus microplus*. *Biochem. J.* 258:79-85.
- Wongso, S, Ushio H., Ohshima T y Yamanaka H. 1998. Changes in content of octopine, acid opines related aminoacids and phosphoarginine in the adductor muscle of three species of scallop during storage. *J. Food Biochem.* 22:65-81.
- Woyewoda, AD., Shaw SJ, Ke PJ. and Burns BG. 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. B. Quality Indices- Refrigerated and iced storage. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences 1448.
- Yamanaka, H., Shiomi K. y Kikuchi T. 1987. Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *J. Food Sci.* 52:936-938.

- Yamazaki, Y., Truong V. y Lowenstein JM. 1991. 5'-Nucleotidase I from rabbit heart. *Biochem.* 30:1503-1509.
- Ya-Pin, Lee. 1957. 5'-adenylic acid deaminase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 227:987-992.
- Yoshioka, T., Kinoshita Y., Yoshino H., Park S., Konno K y Seki N. 2003. Change in translucency of squid mantle muscle upon storage. *Fisheries Sci.* 69:408-413.
- Zekri, M., Habard J., Bernard S. y Meflash K. 1988. Purification of bovine liver cytosolic 5'-nucleotidase. *Eur. J.Biochem.* 172:93-99.
- Zimmermann, H. 1992. Review. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional Aspects. *Biochem. J.* 285:345-365.