

LIPIDOS Y LIPOPROTEINAS PLASMATICAS DE CAMARON

*Gloria Yepiz-Plascencia, Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos,
M.L., Romo-Figueroa, M.G., Jiménez-Vega, F. Vallejo-Cohen,
S. y Vargas-Albores, F.*

**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
Hermosillo, Sonora, A.P. 1735 Hermosillo, Sonora,
83,000 México**

Tel: +52 (62) 80 0057

Fax: +52 (62) 80 0058

e-mail: [gyepiz^o@cascabel.ciad.mx](mailto:gyepiz@cascabel.ciad.mx)

RESUMEN

Los lípidos son moléculas muy importantes para todos los organismos vivos, incluyendo a los crustáceos; ya que son de alto valor energético y proveen componentes indispensables para la formación de membranas. En crustáceos, el colesterol y los ácidos grasos poliinsaturados son además esenciales para un adecuado crecimiento y desarrollo, y por lo tanto deben de ser aportados por la dieta. El transporte de los lípidos en la sangre o hemolinfa es mediado por lipoproteínas. En crustáceos se han identificado lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de muy alta densidad (VHDL). La lipoproteína de alta densidad del camarón blanco tiene una densidad de 1.14 gr/ml y ha sido caracterizada como una molécula compuesta de una apolipoproteína glicosilada de 98 kDa, donde los carbohidratos asociados contienen manosa y los lípidos corresponden a aproximadamente 50% de la molécula. Los lípidos más abundantes en el plasma de camarón blanco y en la lipoproteína son los fosfolípidos, seguido de los acilglicérols, esterols y trazas de ácidos grasos libres, siendo esto similar a los reportes de la HDL del langostino *Pacifastacus leniusculus*. Se determinó la composición de aminoácidos y el terminal amino de la apolipoproteína, encontrándose una alta homología con la HDL de *P. leniusculus*. Se demostró que la HDL se sintetiza y localiza en el hepatopáncreas por inmunocitoquímica y PCR. Utilizando anticuerpos policlonales contra la lipoproteína del camarón blanco, se ha detectado la presencia de proteínas homólogas en la hemolinfa del camarón café (*P. californiensis*) y del camarón azul (*P. stylirostris*). Recientemente se identificó también, una lipoproteína glicosilada de muy alta densidad compuesta por dos subunidades de aproximadamente 200 kDa unidas por puentes disulfuros.

INTRODUCCION

El camarón es uno de los recursos pesqueros más importantes en el Noroeste de México. Su comercialización proviene de la captura de camarón silvestre y de la acuicultura. Esta última toma cada día mas importancia: de las 15, 223 toneladas de camarón obtenidas en el ciclo de 1995, aproximadamente 2,500 correspondieron a camarón de cultivo (SEMARNAP-Imparcial, 1996).

Los métodos de cultivo utilizados van desde un sistema extensivo tradicional hasta uno intensivo, donde la concentración de animales provoca situaciones que ocasionan pérdidas por agresión, canibalismo y, al mismo tiempo, aumentan la susceptibilidad a las enfermedades (Briggs et al., 1988).

Por otro lado, hay que considerar que para tener competitividad es necesario mantener un adecuado control de costos, especialmente del alimento, el cual puede representar hasta el 60% de los costos de producción (Infofish, 1988).

Hasta ahora, la proteína es el componente mas vigilado y costoso de las dietas, sin embargo, el cuidado de la cantidad y calidad de los lípidos está tomando cada vez mas importancia. Por ello, para aumentar la eficiencia en la conversión de alimento a tejido, es necesario profundizar en el conocimiento de los lípidos. Esto permitirá a mediano y largo plazo, optimizar las condiciones de cultivo. Para lograrlo, es necesario estudiar y relacionar los aspectos nutricionales, bioquímicos y fisiológicos de los lípidos y de su transporte desde los sitios de absorción y almacenamiento hasta los sitios donde son utilizados.

En este trabajo, nuestro grupo se ha enfocado al estudio de los lípidos plasmáticos y sus acarreadores que son las lipoproteínas, primeramente identificando las moléculas y después determinando sus características moleculares así como su lugar de síntesis.

LIPIDOS PLASMATICOS

A pesar de que los lípidos son importantes en la alimentación de los crustáceos, incluyendo el camarón, los estudios bioquímicos y la caracterización de estos componentes plasmáticos son escasos.

Los niveles de lípidos plasmáticos en crustáceos son relativamente bajos, sin embargo ocupan el segundo lugar en concentración entre los componentes del plasma, siendo superados solo por la proteínas (Dall et al., 1990). Se ha determinado que en los camarones, al igual que en otros crustáceos, el ácido linoleico, linolénico, araquidónico, eicosapentanoico, docosahexenoico y el colesterol son importantes tanto para el metabolismo energético, como para la formación de membranas celulares y de hormonas durante los procesos de crecimiento, desarrollo, maduración y reproducción (Dall et al., 1993). Sin embargo, mucho falta por conocer sobre su regulación, almacenamiento y transporte.

El principal órgano de reserva de los lípidos es el hepatopáncreas o glándula digestiva de

donde son liberados hacia el plasma (Dall et al., 1990). Aunque los lípidos parecen estar involucrados en la reproducción y ser requeridos para la formación de los huevos, la concentración de proteínas y de lípidos en el plasma del camarón blanco *P. vannamei* juvenil fue muy similar en ambos sexos. Como se aprecia en la Tabla 1, las concentraciones plasmáticas de las proteínas fueron de aproximadamente 100 mg/ml, mientras que la de lípidos fue de aproximadamente 2.4 mg/ml tanto para hembras como para machos (Ruiz Verdugo, 1996). Estos valores son similares a lo reportado respecto a lípidos plasmáticos en *P. japonicus* con 2.5 mg/ml (Lee, 1991) y un rango de 3 a 8 mg/ml (Vazquez-Boucard et al., 1989).

Tabla 1. Concentración de proteína y lípidos en *P. vannamei*

Muestra		Proteína(P) (mg/ml)	Lípidos L) (mg/ml)	L + P (mg/ml)	%L
Plasma	H	96.06 + 1.21 ^a	2.37 + 0.11	98.42	2.4
	M	102.05 + 0.90 ^a	2.55 + 0.11	104.60	2.44
HDL	H	1.85 ^b	1.42 + 0.13	3.28 ^b	43.41 ^b
	M	1.93 ^b	0.94 + 0.06	2.87 ^b	32.87 ^b

^a Media y desviación estándar de tres repeticiones.

^b Datos basados en HDL corregida por ELISA.

Los lípidos plasmáticos del camarón blanco fueron identificados por cromatografía de capa fina (CCF), observándose que los fosfolípidos son los compuestos mas abundantes. Cabe señalar, que el alto contenido de fosfolípidos, es una característica de los crustáceos (Chang y O'Connor, 1983) aunque en el plasma de camarón también se detectaron esteroles y diacilgliceroles (Ruiz Verdugo et al., submitted). El análisis de los fosfolípidos por CCF en dos dimensiones identificó en orden de abundancia, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina y bajas concentraciones de esfingomielina y lisofosfatidilcolina, Figura 1 (Ruiz Verdugo et al., submitted). Estos mismos compuestos se han encontrado en la hemolinfa de diversos crustáceos (Lee, 1991; Lee y Puppione, 1988; Mourente et al., 1994; Spaziani et al., 1986; Spaziani y Wang, 1991; Stratakis et al., 1992).

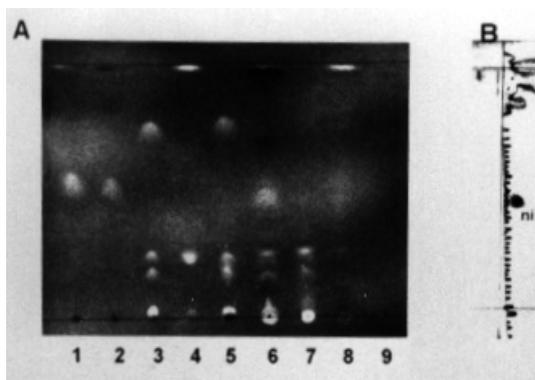


Figura 1. CCF. Análisis de lípidos plasmáticos por TLC. Panel A, lípidos neutros, carril 1, ácido linoleico; carril 2, ácido palmítico; carril 3, acil palmitinas; carril 4, esteroides; carril 5, estearinas; carril 6, plasma de camarones machos; carril 7, plasma de camarones hembras; carril 8, plasma humano; carril 9, BHT. Panel B, separación de fosfolípidos en 2D-CCF; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; LPC, lisofosfatidilcolina; SP, esfingomiélin.

LIPOPROTEINAS PLASMATICAS

Debido a su baja solubilidad en agua, los lípidos requieren una vía de transporte a través del sistema circulatorio de los animales (Haunerland, 1989). Estos acarreadores son proteicos y el complejo lípido-proteína constituyen las lipoproteínas (Lp) (Lee, 1991), las cuales son las responsables de la movilización de lípidos desde los sitios de absorción o almacenamiento, hacia los sitios de utilización. El conocimiento sobre las lipoproteínas de crustáceos es reciente y escaso, siendo superado por los estudios en insectos (Kanost et al., 1990). Actualmente se han descrito dos tipos de lipoproteína en el plasma de los crustáceos. Las lipoproteínas de transporte presentes tanto en machos como en hembras y las vitelogeninas. Estas últimas son lipoproteínas asociadas con la reproducción, específicas de las hembras en estado reproductivo, y son las encargadas del transporte de lípidos hacia los oocitos (Lee, 1991).

LIPOPROTEINAS DE TRANSPORTE

El estudio de las lipoproteínas de transporte es importante desde diversos puntos de vista, incluyendo: la evolución de los medios de transporte de lípidos en animales, su función como proveedores de lípidos para los órganos de utilización, su papel en la movilización de lípidos de reserva, el control hormonal del metabolismo de lípidos y el transporte de lípidos para la formación de membranas (Spaziani y Wang, 1991).

Debido a la presencia de lípidos, la densidad de las lipoproteínas es menor que la de la mayoría de las proteínas. A su vez, la cantidad de los lípidos puede variar y con ello su densidad. Las lipoproteínas se clasifican en base a su densidad en: muy baja densidad (VLDL \ll 1.006 g/ml), baja densidad (LDL 1.006-1.06 g/ml), alta densidad (HDL 1.06-1.21 g/ml) y lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL \gg 1.21 g/ml) (Lee y Puppione, 1978; Lee, 1991; Mathews y van Holde, 1990). La diferencia de densidad también se ha utilizado para el aislamiento de lipoproteínas por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad (Eldestein y Scanu, 1986).

Una Lp de transporte de alta densidad (HDL), no asociada con el sexo se aisló de plasma de *P. vannamei* mediante dos pasos consecutivos de ultracentrifugación en gradiente de densidad de bromuro de potasio. La HDL tiene una densidad en el rango de 1.10 a 1.17 g/ml con un pico máximo a 1.14 g/ml. La presencia de lípidos se corroboró porque la HDL se une al colorante lipofílico negro de Sudán en electroforesis nativas, (Yepiz-Plascencia et al., 1995). Esta HDL está presente en concentraciones similares en camarones juveniles de ambos sexos, por lo que se considera como una lipoproteína no asociada con el sexo (Yepiz-Plascencia et al., 1995). Estas HDLs también se han estudiado y reportado en *P. japonicus* (Teshima y Kanazawa, 1980), y *P. semisulcatus* (Tom et al., 1993).

Aunque con la misma función, la HDL del camarón tiene diferencias con la HDL de otros organismos. Mientras que las lipoproteínas de mamíferos (Roheim, 1986) o insectos tienen dos o más apoproteínas (Kanost et al., 1990), la HDL de *P. vannamei* contiene solo una apoproteína de alto peso molecular, 98 kDa (Figura 2). La proteína además de lípidos asociados, posee residuos de carbohidratos tipo manosa covalentemente ligados al polipéptido, los cuales se

identificaron por medio de reacciones con lectinas (Yepiz-Plascencia et al., 1995).

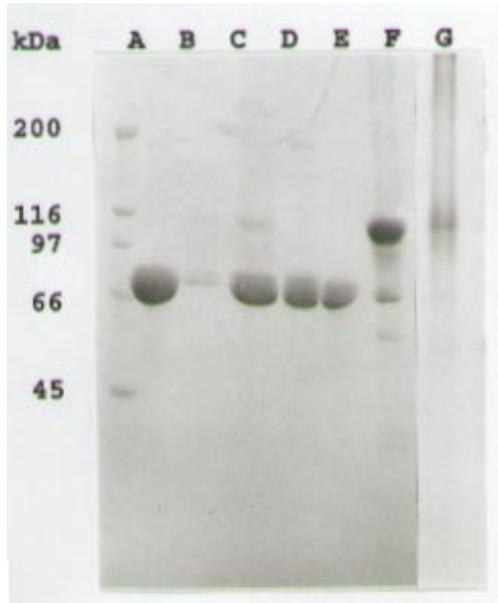


Figura 2. SDS-PAGE. Análisis electroforético de fracciones obtenidas en el aislamiento de la HDL por ultracentrifugación en gradiente de densidad. Estándares de pesos moleculares; A,B,C,D y E , fracciones I, II, III y IV del primer gradiente de ultracentrifugación. A, plasma; B, fracción I; C, fracción II; D, fracción III; E, fracción IV; F y G, HDL aislada por dos gradientes consecutivos de ultracentrifugación.

A la HDL purificada se le determinó su secuencia N-terminal y su composición de aminoácidos (Ruiz Verdugo et al., submitted). Aunque los 15 residuos determinados re-presentan solamente el 2% de la apoproteína, se encontró alta similaridad con el N-terminal de la HDL del langostino *Pacifastacus leniusculus*, (Hall et al., 1995) y el alineamiento de estas dos secuencias se presenta en la Figura 3 (Ruiz Verdugo et al., submitted).

La identidad entre estas dos secuencias es de 67%, subiendo hasta 87% si se toman en cuenta los residuos de aminoácidos reemplazados por un cambio conservativo. Esta similitud es muy alta, considerando el tamaño del fragmento secuenciado y que provienen de un crustáceo marino (camarón) y de uno de agua dulce (langostino), por lo que es posible que esta proteína esté ampliamente distribuida en los crustáceos y que sea altamente conservada.

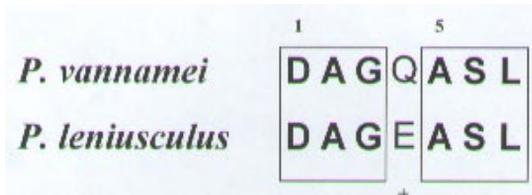


Figura 3. Alineación de las secuencias N-terminal de las HDL de *P. vannamei* y *Pacifastacus leniusculus*. Los residuos encerrados en el cuadro son idénticos en ambas secuencias. Se indican con + los residuos que corresponden a reemplazamientos conservados.

Por su parte, el contenido de aminoácidos de la HDL de camarón refleja un alto contenido de ácido aspártico+asparagina y de ácido glutámico+glutamina, un bajo contenido de metionina y un contenido moderado de aminoácidos aromáticos y básicos (Ruiz-Verdugo et al., submitted), similar a los componentes de la HDL plasmática no asociada con el sexo de *Potamon potamios* (Stratakis et al., 1992).

Los lípidos constituyentes de la HDL purificada y del plasma también han sido estudiados. Para esto se utilizaron microtécnicas enzimáticas acopladas, de forma independiente de HDL de hembras y machos para la cuantificación. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de clases de lípidos en plasma y HDL de camarón (mg/ml)*

Muestra		AGL ¹	ACG ²	Esteroles ²	Fosfolípidos
Plasma	H	3.87 + 0.39	36.84 + 4.89	25.32 + 1.53	1.43 + 0.32
	F	1.26 + 0.23	39.39 + 2.61	27.81 + 1.77	1.39 + 0.29
HDL	H	2.98 + 0.87	29.74 + 0.09	21.17 + 0.49	1.83 + 0.29
	F	2.98 + 0.13	28.90 + 1.11	21.52 + 2.37	1.95 + 0.013

* Media y desviación estándar de tres repeticiones

AGL = ácidos grasos libres,

ACG = acilglicerolos

H = hembras, M = machos

¹ X 10⁻³

² X 10⁻²

Los lípidos mas abundantes tanto en el plasma como en la HDL son los fosfolípidos, seguido de los acilglicerolos, esterolos y ácidos grasos libres, además las concentraciones de los mismos son similares entre ambos sexos (Ruiz-Verdugo et al., submitted). Por sumatoria de los lípidos determinados en la HDL de camarón se calcula que la lipoproteína contiene por lo menos un 32.87% y un 43.41% de lípidos para hembras y machos, respectivamente. Estos son valores intermedios comparados con los reportados para *Cancer antenarius* con 30.7% (Sapaziani y Wang, 1991) y *Pacifastacus leniusculus* con 47.6% (Hall et al., 1995). Cabe señalar, que los valores encontrados dependen de las clases de lípidos y las técnicas utilizadas para la cuantificación, así como de las variaciones entre especies, variaciones provocadas por el clima, el estadio del animal, la temperatura e, incluso, se han reportado variaciones relacionadas con la hora del día en que se colecta la hemolinfa del animal (Vazquez-Boucard et al., 1989).

El método de ultracentrifugación también se ha utilizado para el aislamiento de la HDL del plasma de *P. californiensis* y *P. stylirostris*. La HDL de estas dos especies posee características muy similares a las de *P. vannamei*, es decir son proteínas monoméricas con polipéptidos de aproximadamente 100 kDa, glicosiladas y además, son reconocidas por anticuerpos policlonales preparados contra la HDL de *P. vannamei*.

Además de HDL, en el plasma de camarón hemos identificado otra lipoproteína con mayor densidad (>> 1.17 g/ml) por lo que la hemos considerado como VHDL. Esta lipoproteína se ha aislado también por ultracentrifugación en gradiente de densidad. La VHDL tiene una densidad de aproximadamente 1.22 g/ml y está formada por un polipéptido de aproximadamente 200 kDa unidos por puentes disulfuro y corresponde a la banda tenue localizada en el carril D de la Figura 2. Una VHDL plasmática también ha sido reportada en *P. leniusculus* y está formada por 11.4% de lípidos y un polipéptido de 210 kDa (Hall et al., 1995).

LOCALIZACION Y SITIO DE SINTESIS DE LA HDL

En los mamíferos se conoce que el hígado sintetiza y secreta algunas lipoproteínas (Lehninger et al., 1993). Ya que el hepatopáncreas realiza funciones de tipo hepáticas, y que es el principal órgano de reserva de lípidos en crustáceos (Dall et al., 1990) se investigó la presencia de la HDL en esta glándula por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos anti-HDL. Con esta metodología fue posible detectar la HDL en el citoplasma de las células que forman la capa epitelial de los túbulos del hepatopáncreas (Figura 4).

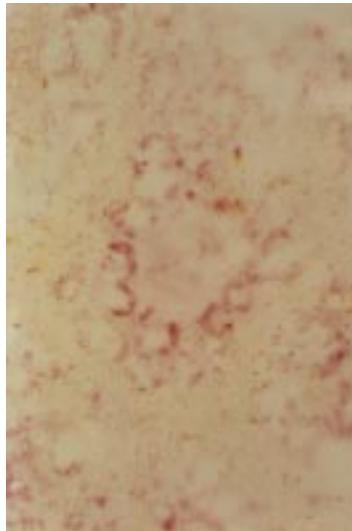


Figura 4. Detección inmunocitoquímica de la HDL en criosecciones de hepatopáncreas de *P. vannamei* (400X).

Aunque estos experimentos localizaron a la HDL en células secretoras del hepatopáncreas, no prueba de forma concluyente que la síntesis de HDL se lleva a cabo en éstas células. Para comprobar este punto, se diseñaron oligonucleótios (primers) a partir del N-terminal de la HDL. Uno de estos oligonucleótidos fue usado primeramente para producir el cDNA (DNA complementario) a partir del mRNA (RNA mensajero) por medio de la enzima transcriptasa reversa. Este cDNA fue posteriormente amplificado por la reacción de polimerasa en cadena, obteniéndose un fragmento de DNA con tamaño de aproximadamente 118 pb. Con estas dos metodologías se comprobó la presencia tanto del RNAm como de la HDL en hepatopáncreas del camarón, de donde es probablemente secretada al plasma.

Una de las principales funciones del hepatopáncreas o glándula digestiva es la secreción de enzimas digestivas (Dall et al., 1990). Entre éstas se incluyen proteasas, lipasas y colagenasas (Dall et al., 1990). En particular, la presencia de quimiotripsina ha sido localizada en las células F (Van Wormhoudt et al., 1995) y la fenoloxidasa en las células R (Yang et al., 1993). Sin embargo, en la HDL además de la síntesis del polipéptido es necesaria la incorporación de los lípidos para producir la lipoproteína completa, proceso que probablemente ocurre en el mismo tejido ya que éste es la reserva principal de lípidos en crustáceos.

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación ha sido apoyada por los proyectos 0564P-N de CONACyT y 2500-1 de International Foundation for Science, aprobados a GYP.

REFERENCIAS

- Briggs, M.R.P., Jauncey, K., and Brown, J.H. 1988. The cholesterol and lecithin requirements of juvenile prawn *Macrobrachium rosenbergii* fed semi-purified diets. *Aquaculture*, 70:121-129
- Chang, E.S., and O'Connor, J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In "The Biology of crustacea"(L.H. Mantel, ed.), Vol 5. Internal Anatomy and Physiological regulation, pp 263-287. Academic Press, New York and London.
- Dall, W., Chandumpai, A. and Smith, D.M. 1993. The fate of some ¹⁴C-labelled dietary lipids in the tiger prawn *Penaeus esculentus*. *Mar. Biol.* 115:39-45.
- Dall, W.; Hill, B.J., Rothlisberg, P.C. and Sharples, D.J. 1990. The biology of Penaeidae. In "Advances in marine biology" (J.H.S. Blaxter y A.J. Southward, ed.) Vol 27 pp21-29. Academic Press.
- Eldestein, C. and Scanu, A.M., 1986. Precautionary measures for collecting blood destined for lipoprotein isolation. *Meth. Enzymol.* 128:151-155
- Hall, M.; van Heusden, M. and Söderhäll, K. Identification of the major lipoproteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216:939-946; 1995
- Hauerland, N.H. and Bauers, W.S. 1989. Comparative studies on arthropod lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B:131-141
- Infofish. 1988. Fish feeds. INFOFISH. Marzo, 18-20.
- Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, H. L. Ryan, R. O., van Heusden, and M. C., Ziegler, R. 1990. Insect hemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22:315-320.

- Lee, R. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. *Adv. Comp. Environ. Physiol.* 7:187-207.
- Lee, R. F. and Puppione, D. L. 1978. Serum lipoproteins in the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 59B:239-243.
- Lee, R. F. and Puppione, D. L. 1988. Lipoproteins I and II from the hemolymph of the Blue Crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *J. Exp. Zool.* 248:278-289.
- Lehninger, A., Nelson, D.L. and Cox, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*. 2nd. ed. Worth Publishers, Inc. New York, USA.
- Mathews, C.K. and van Holde, K.E. 1990. *Biochemistry*. Pp 1129. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Redwood City, CA, USA.
- Mourente, G., Medina, A., González, S. and Rodríguez, A. 1994. Changes in lipid class and fatty acid content in the ovary and midgut of the female fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda, Ocypodiadae) during maturation. *Mar. Biol.* 121:187-197.
- Roheim, P.S., 1986. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism. Role of reserve cholesterol transport. *Am. J. Card.* 57:3C-10C.
- Ruiz Verdugo, L.M. 1996. Caracterización lipídica del plasma y la HDL plasmática del camarón blanco. Tesis de maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos M.L., Vargas-Albores, F. Higuera-Ciajara, I., and Yepiz-Plascencia G. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comp. Biochem. Physiol.* (submitted).
- SEMARNAP. Secretaría del Medio Ambiente de Recursos Naturales y de Pesca. (5 de marzo de 1996) Superan meta camaronera. *Imparcial*:1/E.
- Spaziani, E.; Havel, R. J.; Hamilton, R. L.; Hardman, D. A.; Stoudemire, J. B. and Watson, R. D. 1986. Properties of serum high density lipoprotein in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B:307-314.
- Spaziani, E. and Wang, W.L. 1991 Serum high density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* III. Density gradient profiles and lipid composition of subclasses. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B:555-561.
- Stratakis, E., Fragkiadakis, G. and Carpeli-Moustazi, E. 1992. Isolation and characterization of a non sex-specific lipoprotein from the hemolymph of fresh water crab *Potamon potamios*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373:665-677.

- Teshima, S. and Kanazawa, A. 1980. Lipid constituents of serum lipoproteins in the prawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 46:57-62
- Tom, M., Shenker, O., and Ovadia, M. 1993. Partial characterization of three hemolymph proteins of *Penaeus semisulcatus* de Haan (crustacea, decapoda, penaeidae) and their specific antibodies. *Comp. Biochem. Physiol.* 104B:811-816.
- Van Wormhoudt, A., Sellos, D., Donval A., Palire-Goux, S. and Le Moullac G. 1995. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda). *Experientia* 51:159-163.
- Vazquez-Boucard, C., Galois, R. and Ceccaldi, H.J. 1989. Variations circadiennes des lipides et lipoprotéines de l'hémolymphe, et des lipides de l'hépatopancréas, chez la crevette *Penaeus japonicus*. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* 97:87-93.
- Yang, J.-S., Perng, F.S. and Marshall, M.R. 1993. Immunohistochemical localization of phenoloxidase in hepatopancreas, muscle and epidermis of grass shrimp (*Penaeus monodon* F.). *J. Food. Biochem.* 17:115-124.
- Yepiz-Plascencia, G.; Sotelo-Mundo, R.; Vazquez-Moreno, L.; Ziegler, R. and Higuera-Ciapara, I. 1995. A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B:181-187.