



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
I Z T A C A L A

"CARACTERIZACION DEL SISTEMA DE LA
PROFENOLOXIDASA EN EL ACOCIL

Procambarus clarki"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SALVADOR HERNANDEZ MARTINEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del M. en C. Humberto Lanz Mendoza y la asesoría del M. en C. Efraín Garrido Guerrero, en el laboratorio de de Patología del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, y en el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Morfofisiología de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala-UNAM, respectivamente.

El trabajo fue apoyado por el proyecto de investigación CONACYT 0325 N9107.

DEDICATORIA

"El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar. Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos".

Padre: en las recias luchas de la vida,
cuando mi pobre voluntad flaquea,
¿Quién, si no tú, me alienta en la caída?
¿Quién, si no tú, me ayuda en la pelea?

¡Madre, madre, si supieras
Cuantas sombras de tristeza
Tengo aquí!
¡Si me oyeras, y si vieras
Esta lucha que ya empieza
Para mí!

A mis padres Salvador y Rosa, que sin su apoyo no habría sido posible dar este paso. Mi más sincero agradecimiento.

A mis hermanos: Gonzalo, Juana, Leticia, Esmeralda y René.

A mis amigos: Rodolfo, Alma y Toño, que cada uno a su modo siempre estuvieron a mi lado brindandome su apoyo y comprensión.

Con todo mi cariño, ala mujer que ha decidido compartir con migo alegrías y tristezas... Lety

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco de manera muy especial al M. en C. Humberto Lanz Mendoza por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por la paciencia mostrada para guiarme con pasos firmes a través del difícil camino de la investigación y por la confianza que ha despertado en mi para emprender nuevos proyectos de superación. Por lo anterior, mil gracias.

Agradezco el apoyo brindado por el M. en C. Efraín Garrido Guerrero, por todas sus opiniones, consejos y sugerencias durante el desarrollo del trabajo, así como por el alto valor de crítica mostrado hacia la honestidad y calidad por el trabajo en el laboratorio.

Agradezco a todos los compañeros del laboratorio de Inmunología de la ENEP-Iztacala, y en especial al Dr. Rafael Jiménez y a la Biol. Julia Reyes, por su apoyo incondicional.

A todos los integrantes del laboratorio de Patología del CINVESTAV, y de manera muy especial al Dr. V. Tsutsumi, por facilitar el equipo y material necesarios para la elaboración del trabajo experimental y la redacción del escrito final.

Mi más sincero agradecimiento para Alicia Ramírez, por su gran amistad y consejos.

También quiero hacer patentes mis agradecimientos al M. en C. Ignacio Peñaloza, a la M. en C. Martha O. Salcedo y al Biol. Rafael Quintanar por sus valiosas opiniones durante la revisión del trabajo final.

A todas las personas que de algún modo hayan estado cerca durante el desarrollo del trabajo.

1. INDICE

1. INDICE.....	i
2. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	iii
3. RESUMEN.....	v
4. INTRODUCCION.....	1
4.1. Características de la respuesta inmunitaria de los invertebrados.....	2
4.2. Importancia biológica y económica de los crustáceos.....	6
5. INMUNIDAD EN CRUSTACEOS.....	10
5.1. Inmunidad innata.....	10
5.2. Reconocimiento de lo propio y lo no propio.....	10
5.3. Inmunidad humoral.....	11
a) Lectinas.....	11
5.4. Inmunidad celular.....	13
a) Características de las células sanguíneas....	13
b) Fagocitosis y citotoxicidad	14
c) Encapsulamiento.....	15
d) Sistema de la profenoloxidasa (proPO).....	16
6. JUSTIFICACION DEL TRABAJO Y OBJETIVOS.....	23
7. MATERIAL Y METODOS.....	25
7.1. Organismos. Origen y mantenimiento.....	25
7.2. Obtención de la hemolinfa.....	25
7.3. Determinación citoquímica del sistema de la profenoloxidasa (proPO).....	25
a) Cinética de adherencia celular al vidrio.....	25
b) Incubación de hemocitos con L-DOPA.....	26
c) Incubación de hemocitos con L-DOPA oxidada... 26	
7.4. Obtención del sistema de la proPO en el Sobrenadante de Lisados de Hemocitos (SLH)... 27	
a) Obtención del SLH con macerador celular.....	27
b) Obtención del SLH con detergente NP-40.....	27
c) Obtención del SLH por ciclos de congelamiento/descongelamiento.....	27
d) Obtención del SLH por sonicado.....	28
7.5. Ensayo de actividad de fenoloxidasa (PO).....	28
7.6. Efecto de diferentes inhibidores de proteasas en la activación del sistema de la proPO.....	29
7.7. Electroforesis del SLH en geles de Poliacrilamida-SDS.....	29
8. RESULTADOS.....	31
8.1. Determinación citoquímica del sistema de la proPO.....	31
8.2. Obtención del sistema de la proPO en el sobrenadante de lisados de hemocitos (SLH) por congelamiento/descongelamiento.....	32
8.3. Activación del sistema de la proPO con diferentes carbohidratos.....	33
a) Curvas de activación con lipopolisacárido (LPS) y zimosán (Zs).....	34

8.4. Efecto de inhibidores de proteasas en la activación del sistema de la proPO.....	35
8.5. Electroforesis en geles de Poliacrilamida-SDS...	36
9. DISCUSION.....	38
10. CONCLUSIONES.....	46
11. BIBLIOGRAFIA.....	47
12. APENDICES.....	57
13. FIGURAS.....	60

2. LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.

- FIG. 1. Esquema de activación del sistema de la proPO.
- FIG. 2. Cinética de adherencia celular al vidrio.
- FIG. 3. Tipos de hemocitos presentes en la hemolinfa de P. clarki.
- FIG. 4. Reacción citoquímica de fenoloxidasa en los hemocitos del acocil.
- FIG. 5. Cinética de marca con L-DOPA.
- FIG. 6. Curva de activación del sistema de la proPO en el SLH con distintas concentraciones de lipopolisacárido.
- FIG. 7. Curva de activación del sistema de la proPO en el SLH con distintas concentraciones de zimosán.
- FIG. 8. Efecto de distintos inhibidores de proteasas sobre la activación del sistema de la proPO con LPS (20 $\mu\text{g/ml}$).
- FIG. 9. Efecto de distintos inhibidores de proteasas sobre la activación del sistema de la proPO con zimosán (5 μg eq. de gluc/ml).
- FIG.10. Efecto de la mezcla de STI con los inhibidores de cisteín proteasas (N-E, N-M, IAM) sobre la activación del sistema de la proPO con zimosán (5 μg eq. de gluc/ml).

FIG.11. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15 %.

Cinética de activación del sistema de la proPO con zimosán (5 µg eq. de gluc/ml).

FIG.12. Electroferesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15 %.

Cinética de activación del sistema de la proPO con LPS (20 µg/ml).

FIG.13. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15 %.

Efecto de diferentes inhibidores de proteasas sobre la activación del sistema de la proPO en el SLH.

TABLA I. Carbohidratos utilizados para el estudio de la activación del sistema de la proPO.

TABLA II. Absorbancias (D.O) encontradas durante ensayos de fenoloxidasa.

3. RESUMEN

v

En países en desarrollo como México, el cultivo de crustáceos ha adquirido una gran importancia económica. Sin embargo, las enfermedades causadas por parásitos han limitado su producción a gran escala. Dentro de los mecanismos de defensa más importantes de los crustáceos, se encuentra el sistema de la profenoloxidasa (proPO), el cual es considerado análogo a la vía alterna del complemento de mamíferos. Consiste de una cascada proteolítica que puede ser activada por componentes de la pared celular microbiana como el β -1,3 glucano y el LPS, y que culmina con la formación de melanina.

En estudios citoquímicos, utilizando L-DOPA como sustrato, se observó la presencia del sistema de la proPO en los hemocitos granulares y subgranulares del acocil Procambarus clarki. El sistema se recuperó del sobrenadante del lisado de hemocitos por la técnica de congelamiento/descongelamiento y sólo fue activado por zimosán (β -1,3 glucano) o por lipopolisacárido. La activación fue bloqueada por inhibidores para serina proteasas. Inhibidores para cisteín proteasas produjeron una hiperactivación del sistema. El análisis electroforético del lisado de hemocitos mostró dos moléculas de 37 y 39 kDa sensibles a los inhibidores para serina proteasas, probablemente involucrados en la activación del sistema y un polipéptido de 41 kDa sensible a inhibidores para cisteín proteasas que posiblemente se encuentre involucrado en la regulación del sistema de la proPO en P. clarki.

4. INTRODUCCION

Los invertebrados se encuentran muy diversificados en la naturaleza; incluyen cerca de dos millones de especies contenidas en más de 20 fila, desde organismos unicelulares hasta los más complejos protostomados. Ocupan todos los nichos ecológicos y en su mayoría forman parte importante dentro de las cadenas tróficas.

Dentro de los invertebrados, el grupo de los artrópodos es uno de los más importantes, ya que contiene el mayor número de especies dentro del reino animal, y una amplia distribución en la naturaleza. Estos organismos aparecieron desde el Cámbrico y se han diversificado a gran escala. Con tales características este grupo se vuelve muy interesante, como modelo, para el estudio de procesos biológicos en otros organismos, como por ejemplo la respuestas inmune. Sin embargo, en la actualidad toda la información sobre la respuesta inmune se ha obtenido de una clase del filum Vertebrata y esencialmente del ratón (Cooper y cols. 1992).

Sin lugar a dudas el sistema inmune es una característica común dentro del reino animal, pero el grado de interrelaciones y orígenes evolutivos entre vertebrados e invertebrados es pobremente conocido.

El estudio de la respuesta inmune en invertebrados, ha llevado a discusiones debido a dos problemas fundamentales: 1) la tendencia a generalizar los resultados en todos los invertebrados, cuando es claro que los invertebrados forman

un grupo muy diversificado de animales (Bang 1966), y 2) ² la predisposición para investigar y definir la respuesta inmune en invertebrados en base al conocimiento que tenemos en vertebrados (Bang 1966, Hilgard y cols. 1974, Nappi 1974).

Tomar en cuenta estas consideraciones es esencial para trazar los posibles orígenes de la respuesta inmunitaria de vertebrados, lo cual nos ayudaría a comprender mejor su funcionamiento y las posibles relaciones filogenéticas.

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LOS INVERTEBRADOS.

La característica más importante que define la respuesta inmunitaria de un organismo, es la capacidad de reconocer lo propio de lo no propio, y los invertebrados tienen esta capacidad, al discernir y eliminar partículas extrañas a pesar de carecer de inmunoglobulinas y linfocitos. El reconocimiento de lo no propio puede ser observado desde protozoarios, que muestran incompatibilidad al trasplante de núcleos extraños. Cuando el núcleo transplantado es de la misma especie el porcentaje de rechazo es menor (Cooper 1981). Estas reacciones unicelulares pueden ser precursoras del reconocimiento específico contra lo no propio del organismo.

Se ha observado que cuando dos esponjas de especies diferentes son disgregadas y mezcladas, éstas se vuelven a reagrupar sin mezclarse, lo que sugiere un eficiente sistema de reconocimiento de lo propio y lo extraño (Cooper 1981).

Los anélidos también muestran un rechazo a injertos, el cual es mucho más violento en una segunda implantación. Estos resultados pueden sugerir la existencia de un incipiente sistema de memoria. Por otro lado, la hemolinfa de un invertebrado se puede transferir a otro de su misma especie para conferirle protección de corta duración e inespecífica (Cooper 1974).

En la actualidad se conoce que los invertebrados poseen un sistema de defensa que con fines prácticos se divide en celular y humoral:

a) Respuesta inmune celular.

Las reacciones de defensa celular en invertebrados son de primordial importancia para combatir invasiones por microorganismos. Se caracteriza por ser inmediata y no inducible, y se encuentra representada por la fagocitosis, el encapsulamiento y la coagulación (Cooper 1974, Johansson y Söderhäll 1989a).

1) **Fagocitosis.** La fagocitosis surgió primero que cualquier otro mecanismo de defensa específico e inespecífico, y en todos los organismos que se han estudiado se ha observado la presencia de células con capacidad fagocítica.

La fagocitosis es una función ancestral. En protozoarios (p. ej. amibas) une a un mecanismo de defensa con un medio de obtención de alimentos. Estos organismos fagocitan por medio de un reconocimiento mediado por receptores de membrana. En esponjas, la fagocitosis por amebocitos juega también un

papel importante en la alimentación y defensa del organismo (Cooper 1981).

Los anélidos, moluscos e insectos presentan células llamadas celomocitos muy eficientes en la eliminación de partículas extrañas por fagocitosis, misma que en ocasiones se ve incrementada por la presencia de sustancias opsonizantes en la hemolinfa (Tyson y Jenkin 1973). La fagocitosis se ha estudiado con mayor detalle en insectos, donde el mecanismo es esencialmente el mismo que el de otras células fagocíticas, y consiste de tres pasos: 1) unión y reconocimiento de la partícula extraña, 2) ingestión y 3) destrucción y digestión. Durante este proceso se ha observado la fusión del fagosoma con lisosomas y la liberación de enzimas lisosomales (Ratcliffe y Rowley 1979).

2) **Encapsulamiento y coagulación.** La cápsula es un agregado de hemocitos que se forma alrededor de partículas que no pueden ser fagocitadas por su gran tamaño. Cuando un parásito penetra en la cutícula de un artrópodo, éste último reacciona encapsulándolo y con frecuencia lo melaniza (Unestam y Nyhlén 1974, Söderhäll y cols. 1979). Asimismo, se presentan mecanismos de coagulación para atrapar parásitos y prevenir pérdidas de sangre a través de heridas, siendo estas reacciones realizadas por las células sanguíneas circulantes (hemocitos) que proveen factores requeridos para la coagulación del plasma (Durliat 1981, Durliat 1985, Johansson y Söderhäll 1989a).

b) Respuesta inmune humoral.

En lo que se refiere a la respuesta humoral, se caracteriza por ser tardía e inducible y mediada por proteínas antibacterianas, las cuales son sintetizadas después de la infección o una herida. Algunas de estas proteínas han sido aisladas de diferentes invertebrados y dentro de las más importantes encontramos a las atacinas, las cecropinas, la melitina, las lisozimas, las díptericinas y las lectinas (Boman y Hultmark 1987).

Bang (1966) observó la aparición de sustancias líticas (lisinas) contra protozoarios flagelados después de la inyección de éstos en el hemocele de Sipunculus nodus, las cuales desaparecen varios días después de haber sido eliminado el material extraño. Asimismo observó la aparición de sustancias antibacteriales que son aparentemente liberadas por células de la hemolinfa.

4.2. IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y ECONÓMICA DE LOS CRUSTACEOS.

Los crustáceos forman un grupo de organismos de gran éxito en la naturaleza. Los podemos encontrar tanto marinos como dulceacuícolas y varias especies han invadido el medio terrestre; los hay también sésiles y de vida libre así como algunos parásitos altamente especializados, y otros que son la base dentro de algunas cadenas tróficas (Barnes 1987). Desde su aparición hace 20 millones de años en el período Triásico han sufrido pocos cambios morfológicos, y en la actualidad se pueden encontrar organismos verdaderamente pancrónicos (Llera 1984).

El grupo de los crustáceos es de gran interés en la actualidad, debido a que representan una fuente alternativa de obtención de alimentos y de empleos. Particularmente la camaronicultura se encuentra en pleno crecimiento y presenta grandes perspectivas de desarrollo.

Para México, en los últimos años la pesca de camarón se ha mantenido en 73 mil toneladas anuales, con lo cual ocupa el 7o. lugar como productor de camarón a nivel mundial (Acuavisión 1986, Secretaría de Pesca 1989). Sin embargo, la demanda supera la captura, por lo cual ha sido necesario buscar alternativas como el cultivo controlado de estos organismos.

Hasta 1984, la producción mundial cultivada fue de 111 mil toneladas, equivalentes al 7 % del total desembarcado a

nivel mundial. En ese mismo año México produjo 300 toneladas de camarón en cultivo, de las cuales el 90 % fue comercializada al mercado estadounidense (Secretaría de Pesca 1987).

En nuestro país se ha registrado un avance considerable en el desarrollo del cultivo de camarón. De octubre de 1987 a abril de 1989 se construyeron 100 unidades de producción, teniendo en proceso de construcción 34 nuevas granjas. La producción en 1987 alcanzó 1700 toneladas y al finalizar 1988 se alcanzaron las 3600 toneladas (Secretaría de Pesca 1989).

Como hemos visto el cultivo de camarón representa una fuente de grandes beneficios alimenticios y económicos. Sin embargo, se obtiene casi por completo a través de la captura, la cual ha llegado a su punto máximo de rendimiento.

Aunque el camarón (Penaeus stylirostris y Penaeus vannamei), continúa siendo el principal crustáceo que demanda el mercado nacional e internacional, existen varios crustáceos en México con posibilidades comerciales. Se cuenta con la tecnología de cultivo para el langostino malayo (Macrobrachium rossebergii), y recientemente ha surgido en México el interés por el cultivo del "cangrejo de río" (Procambarus clarki), de la "langosta australiana" (Quadricarinatus tenuimanus), la jaiba (Callinectes sp.) y la langosta (Panulirus argus) (Armijo 1992).

No obstante, las grandes concentraciones de organismos en áreas pequeñas y cerradas ofrecen un medio adecuado para que proliferen parásitos y microbios patógenos.

Se han citado diferentes condiciones que propician el desarrollo de microorganismos en el cultivo de camarón, tales como: 1) parásitos que puedan producir sustancias que disminuyan la actividad del sistema inmunitario, 2) debilidad debida a deficiencias nutricionales del animal, 3) alta densidad de la población, 4) manipulación inadecuada y 5) mala calidad del agua (Universidad de Sonora 1985, Brick y Davis 1987, Ramírez 1988).

Se han reportado cerca de 20 enfermedades virales (principalmente por baculovirus) en varias especies de crustáceos, pero se carece de estrategias o metodologías de tratamiento, y sólo se cuenta actualmente con técnicas moleculares para su diagnóstico, que en países en desarrollo no se practican por su elevado costo (Universidad de Sonora 1985, Bonami 1992).

Las enfermedades causadas por bacterias son reportadas como las más abundantes, siendo el género Vibrio sp. el más comunmente encontrado. La infección bacteriana se puede localizar en la cutícula o dentro del cuerpo del animal. Se desconoce la forma de tratar dichas enfermedades (Universidad de Sonora 1985).

Las enfermedades causadas por hongos en los crustáceos son consideradas las más devastadoras en todo el mundo. Para controlar estas enfermedades se han empleado diferentes sustancias químicas y antibióticos con resultados no muy satisfactorios, puesto que se han llegado a desarrollar cepas resistentes además de que algunas de las sustancias químicas

utilizadas son tóxicas para el hombre (Universidad de Sonora 1985, Bautista 1988).

Como se puede observar, no existen metodologías eficaces para combatir las enfermedades en cultivos de crustáceos, debido a la falta de técnicas y estrategias de estudio de su respuesta inmunológica. Por lo anterior, consideramos que es apremiante la realización de trabajos que aporten conocimientos respecto a los mecanismos inmunológicos de estos organismos, que en determinado momento puedan contribuir a la solución de algunos de estos problemas.

5. INMUNIDAD EN CRUSTACEOS.

A continuación se analizarán los mecanismos inmunitarios más importantes de los crustáceos.

5.1. INMUNIDAD INNATA.

Al igual que los mamíferos, los crustáceos presentan mecanismos de defensa innatos contra invasiones por microorganismos. El exoesqueleto de quitina forma una eficiente barrera mecánica, y la secreción de inhibidores contra enzimas proteolíticas confiere protección contra la invasión por algunos hongos (Häll y Söderhäll 1982). La capa de cera presente en la endocutícula juega también un papel muy importante dentro de la defensa contra microorganismos por ser fungistática y bactericida; además por sus propiedades hidrofóbicas, no permite que se adhieran microorganismos en la superficie corporal del crustáceo (Grassé 1985). La continuación de la endocutícula en el estomodeo y proctodeo y la secreción de enzimas en el mesodeo (estómago), que confieren un pH ácido, son también mecanismos adecuados contra invasores adquiridos durante la alimentación (Barnes 1987).

5.2. RECONOCIMIENTO DE LO PROPIO Y LO NO PROPIO.

Los crustáceos tienen la capacidad de reconocimiento de material extraño. Sin embargo, el mecanismo no está

totalmente claro. Se ha observado que algunos crustáceos como langostinos y langostas, pueden eliminar rápidamente moléculas extrañas (Sloan y cols. 1975). De hecho, estudios realizados en el acocil Procambarus clarki sugieren que el organismo elimina de circulación proteínas no propias (p. ej. albúmina sérica bovina), lo cual no sucedió al ser inoculado con una molécula propia (hemocianina). Estas observaciones apoyan la existencia de receptores naturales en la superficie de los hemocitos o moléculas de reconocimiento en el plasma; y aún cuando la especificidad para cada molécula por separado no fue observada, se sugiere que estos organismos son capaces de diferenciar moléculas, conservando las propias y eliminando las extrañas.

5.3. INMUNIDAD HUMORAL.

a) LECTINAS.

Es poco el conocimiento que se tiene en cuanto a la participación de las lectinas en la respuesta inmune humoral de los crustáceos y los trabajos realizados se han centrado principalmente sobre su especificidad y su purificación.

Las lectinas, también llamadas aglutininas o hemaglutininas, son proteínas o glicoproteínas que se unen en forma específica y reversible a carbohidratos, por lo que son capaces de precipitar glicoconjugados y aglutinar eritrocitos, bacterias y otras células que tengan la complementariedad requerida (Lanz 1988, Vargas 1992).

Miller (1972) estudió la capacidad aglutinante de la hemolinfa de P. clarki donde observó la aglutinación de eritrocitos de gallina, de conejo y bacterias marinas. Lanz (1988) también observó que la hemolinfa de P. clarki presenta capacidad aglutinante sobre eritrocitos de diferentes vertebrados debido a la probable presencia de lectinas, las cuales mostraron especificidad por N-acetilglucosamina, lactosa y manosa.

Ravindranath y cols. (1985) estudiaron las propiedades de una lectina del cangrejo Cancer antennarius que presentó especificidad por el ácido D-acetil siálico y la relacionaron con el mecanismo de reconocimiento de partículas extrañas. Vázquez y cols. (1988) encontraron estas mismas propiedades en los acociles Cambarelus sp., Procambarus clarki y Macrobrachium rosenbergii. Recientemente, Vasquez y cols. (1991) purifican una lectina del langostino M. rosenbergii, la cual se encuentra en una concentración menor al 1 % de la proteína total de la hemolinfa, caracterizandola como una glicoproteína de 14 kDa, compuesta principalmente por glicina, serina y ac. glutámico. Esta lectina presenta especificidad por eritrocitos de rata y conejo y su actividad es inhibida por carbohidratos N-acetilados y N-glicosilproteínas de la membrana de eritrocitos de rata.

Los estudios de la participación de las lectinas en la respuesta inmune humoral de los crustáceos son muy escasos, por lo cual es necesaria la realización de investigaciones que permitan comprender más claramente su relación y función

dentro de los mecanismos de defensa de estos organismos.

5.4. INMUNIDAD CELULAR.

a) CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS SANGUINEAS.

Los decápodos presentan varias poblaciones de hemocitos circulantes en la hemolinfa, para los cuales se han reportado funciones de metabolismo de carbohidratos, transporte y almacenamiento de lipoproteínas y aminoácidos, reparación de heridas, coagulación de la hemolinfa y defensa contra la invasión por microorganismos o parásitos (Söderhäll y Smith 1983). En general se han observado 2 tipos de hemocitos en los crustáceos: 1) las células hialinas, las cuales se caracterizan por presentar actividad fagocítica, así como una participación importante en la formación de nódulos y en la cicatrización de heridas (Ratcliffe y Rowley 1979); y 2) las células granulares, las cuales se dividen en células de gránulos grandes y células de gránulos pequeños. Las de gránulos grandes se han reportado como eventuales fagocíticas, además de participar en los procesos de coagulación y liberación de aglutininas; y las de gránulos pequeños se reportan como fagocíticas, que participan en el encapsulamiento y en los procesos de coagulación y liberación de aglutininas (Johansson y Söderhäll 1989, Durliat 1981, Durliat 1985).

En el acocil *P. clarki* se han determinado 3 tipos celulares (hialinas, granulares y subgranulares), por medio

de estudios citoquímicos y morfológicos (Lanz y cols. 1992).

b). FAGOCITOSIS Y CITOTOXICIDAD

El primero en observar el proceso fagocítico en crustáceos fue Metchnikoff en 1884, al estudiar la propiedad fagocítica de células sanguíneas de Daphnia sp. ante la presencia de esporas (cf. Bang 1983). En años más recientes, McKay y Jenkin (1969), y Tyson y Jenkin (1974) lograron observar que los hemocitos del acocil Parachaeraps bicarinatus poseen capacidad fagocítica, y que probablemente presentan receptores de superficie de tipo lectina, los cuales pueden ser responsables del reconocimiento de las partículas extrañas.

Söderhäll y Smith (1983) lograron separar tres subpoblaciones de hemocitos circulantes en la hemolinfa de decápodos marinos, lo cual les permitió observar que las partículas extrañas son fagocitadas por hialinas y semigranulares en cultivos celulares mixtos, mientras que en cultivos de las subpoblaciones por separado esta actividad sólo se observó en las células hialinas. Estos mismos resultados se observaron en el cangrejo Carcinus maenas, en cultivos de hemocitos con la bacteria Moraxella sp., encontrándose además, que la fagocitosis puede ser estimulada por la presencia de β -1,3 glucanos (Smith y Söderhäll, 1983b).

Por otra parte, se ha observado que los hemocitos de crustáceos presentan capacidad citotóxica. Tyson y Jenkin

(1974), confirmaron este mecanismo utilizando líneas celulares tumorales que sirvieron como blanco de los hemocitos citotóxicos. Los resultados de Tyson y Jenkin (1974) sugieren que sólo dos de los tres tipos celulares presentes en la hemolinfa de Parachaeraps bicarinatus presentan capacidad citotóxica.

Recientemente se observó que los hemocitos de otros invertebrados son capaces de destruir células tumorales; sin embargo no queda claro como es que estos hemocitos pueden reconocer y destruir células extrañas de manera similar a los efectos citotóxicos mostrados por células NK (natural killer), linfocitos T citotóxicos, o macrófagos activados (Cooper y cols. 1992).

c). ENCAPSULAMIENTO.

La cápsula es un agregado de células alrededor de partículas extrañas que inactiva parásitos tales como protozoarios o nématodos y cualquier partícula que sea de tamaño muy grande para ser fagocitada. Las cápsulas están formadas por 2 capas: la más externa es inerte, no celular y posiblemente quitinosa; y la otra es interna, de tipo celular e inmóvil y en la cual se observa la secreción de un pigmento oscuro (probablemente melanina) (Cooper 1981).

Unestam y Nyhlén (1974) observaron que los acociles Astacus astacus y Pacifastacus leniusculus, cuando fueron penetrados en su cutícula por el hongo Aphanomyces astaci y algunos otros ficomicetos, reaccionaron formando cápsulas y

melanizando a las hifas. Resultados semejantes se observaron al inocular esporas de estos hongos. Así mismo, se observó que al introducir fibras de algodón o nylon también eran encapsuladas. Lo anterior sugiere que esta actividad es de tipo inespecífico contra materiales extraños.

Söderhäll y cols. (1979) observaron que en el acocil Astacus astacus los hemocitos granulares participan en la formación de cápsulas al liberar sus gránulos ante la presencia de hifas de A. astaci. Posteriormente, Persson y Söderhäll (1987) encontraron que las células semigranulares de Astacus leptodactylus formaban rápidos agregados sobre la superficie de esporas de Aspergillus niger; las células hialinas no respondieron y las granulares lo hicieron con menor intensidad. Sin embargo, si las esporas eran previamente tratadas con el lisado de hemocitos semigranulares, las células granulares formaban rápidos agregados. Las observaciones realizadas por Persson y Söderhäll (1987) sugirieron la presencia de un "factor promotor de la encapsulación", el cual aparece con la exocitosis de las células semigranulares y granulares.

Kobayashi y cols. (1990) confirmaron la hipótesis del factor de encapsulación propuesta por Persson y Söderhäll (1987), y demostraron que se trata de una proteína de 76 kDa ya descrita para funciones como promotor de adhesión celular (Johansson y Söderhäll 1988) y de degranulación (Johansson y Söderhäll 1989b), y además promueve la encapsulación en células semigranulares y en menor grado de células granulares

(Kobayashi y cols. 1990).

Como se puede apreciar, la molécula de 76 kDa es una proteína multifuncional que se encuentra directamente relacionada con las funciones inmunes celulares y la cual aparece junto con la liberación de los gránulos de las células granulares y semigranulares.

d). SISTEMA DE LA PROFENOLOXIDASA (proPO).

En vertebrados el sistema de complemento juega un papel clave en la inmunidad no específica e inflamación, y algunos investigadores sugieren que la vía alterna podría haberse originado en invertebrados (Cooper y cols. 1992). Al respecto existe un gran interés en el sistema de activación de la profenoloxidasa (proPO), el cual es propuesto como un mecanismo muy importante de reconocimiento y defensa en crustáceos y similar al complemento vía alterna de mamíferos (Söderhäll 1982, Söderhäll y Ajaxón 1982, Johansson y Söderhäll 1989a).

El sistema de la proPO se encuentra contenido dentro de los hemocitos granulares y semigranulares y es liberado por la presencia de compuestos microbianos como el β -1,3 glucano de la pared celular de los hongos o el Lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram (-). Un vez liberado el sistema puede ser activado por las mismas moléculas y durante su activación se liberan componentes que regulan de manera importante la respuesta celular de los crustáceos. La cascada culmina con la formación de melanina que es un compuesto tóxico para

hongos y bacterias (Johansson y Söderhäll 1985a).

La importancia de el sistema de la proPD en la defensa es también observada por el hecho de que ciertos parásitos han desarrollado mecanismos para evadir o inhibir ésta activación (Johansson y Söderhäll 1989a). Por ejemplo, algunos hongos entomopatogénicos producen protoplastos sin glucanos en su pared celular (Söderhäll 1982); y otros hongos producen toxinas que inhiben a los glucanos que activan el sistema de la proPD, o al mismo sistema (Lackie 1988a).

Para facilitar el estudio del sistema de activación de la profenoloxidasa, se ha dividido este mecanismo en 4 pasos: reconocimiento, activación, amplificación y regulación.

Reconocimiento. El reconocimiento del material extraño es el primer paso necesario para que se pueda liberar el sistema de la proPD. Duvic y Söderhäll (1990) encuentran en el plasma del langostino Pacifastacus leniusculus una proteína de 100 kDa que tiene la capacidad de unirse al β -1,3 glucano. Esta proteína, que se conoce como la proteína de unión al β -1,3 glucano (GBP), es reconocida por receptores específicos que se encuentran en la superficie de los hemocitos semigranulares y provoca su exocitosis y la liberación del sistema de la proPD (el mecanismo es desconocido). Jomori y cols. (cf. Söderhäll y cols. 1990), también encuentran una proteína de unión a LPS (LBP) en la hemolinfa de la cucaracha Periplaneta americana, que se encuentra involucrada en el reconocimiento del LPS.

Activación. La bioquímica de activación del sistema de

la proPO no es muy clara, pero se han realizado progresos considerables en cuanto a la purificación y caracterización de diferentes proteínas asociadas con el sistema (Söderhäll 1983, Ashida y Söderhäll 1984, Söderhäll y Häll 1984, Söderhäll y cols. 1990, Aspán y cols. 1990a, Aspán y cols. 1990b, Aspán y Söderhäll 1991).

Una vez libre el sistema en el plasma, la activación se inicia cuando la profenoloxidasa (proPO) es activada y convertida a fenoloxidasa, por una enzima denominada proteína activadora de la proPO (ppA), la cual es una proteína del tipo de las serina proteasas con un peso molecular de 36 kDa (Aspán y cols. 1990a). En los crustáceos la ppA es activada directamente por β -1,3 glucano (Söderhäll 1982) o por LPS y peptidoglicanos (Söderhäll y Häll 1984). Esta activación puede ser mejorada en presencia de las proteínas de unión (LBP y GBP), pero se desconoce el mecanismo (Söderhäll 1992). La ppA también puede ser activada por una baja concentración de calcio "in vitro" (Ashida y Söderhäll 1984), pero el significado de éste efecto "in vivo" no queda totalmente claro, y se sugiere que podría ser importante en la respuesta durante heridas y en el control de reacciones homeostáticas (Johansson y Söderhäll 1989a).

La enzima activa, fenoloxidasa, puede catalizar la o-hidroxilación de monofenoles y la oxidación de difenoles a quinonas (Galindo y cols. 1983, Söderhäll y cols. 1990) y el producto final de la reacción es la melanina la cual se forma a partir de una polimerización no enzimática de las quinonas

(Söderhäll 1982, Johansson y Söderhäll 1989a, Söderhäll y cols. 1990).

Recientemente la proPO se purificó del acocil P. leniusculus por Aspán y Söderhäll (1991), y se observó que tiene un peso molecular de 76 kDa en forma inactiva y al ser activada por la ppA se producen 2 enzimas con actividad de fenoloxidasa con pesos moleculares de 60 y 62 kDa.

Amplificación. Al ser activada la proPO y convertida a fenoloxidasa (PO), se estimulan varias reacciones de defensa celular, incluyendo fagocitosis (Söderhäll y cols. 1986); formación de nódulos (Lackie 1988a); encapsulación (Persson y Söderhäll 1987, Kobayashi y cols. 1990) y locomoción de hemocitos (quimiocinesis) (Lackie 1988a). Con la liberación del sistema de la proPO también es liberada una proteína de 76 kDa que promueve la degranulación de hemocitos granulares y semigranulares, y por lo tanto la liberación de más proPO (Johansson y Söderhäll 1985, Johansson y Söderhäll 1988). Esta proteína presenta además otras funciones, como estimular la adherencia celular (Johansson y Söderhäll 1989b) y la formación de cápsulas (Kobayashi y cols. 1990). La importancia de esta proteína es aún mayor por el hecho de presentar una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), la cual también se encuentra presente en varias proteínas con función de adherencia celular, como lo es la fibronectina de vertebrados (Söderhäll 1992).

Regulación. Como hemos visto, al ser activado el sistema de la proPO puede ser amplificado, y como es común en los

sistemas biológicos que incluyen cascadas enzimáticas, deben existir mecanismos de regulación que eviten autoactivaciones, o bien, hiperactivaciones que culminen con la coagulación del plasma y la muerte del organismo.

Existen dos inhibidores de proteasas en el plasma que pueden bloquear la activación del sistema de la proPO en lugares donde la melanización puede ser inapropiada. Estos inhibidores actúan sobre la actividad de la ppA y por tanto previenen la activación del sistema. Estos dos inhibidores fueron purificados del plasma de langostinos; uno es una α_2 -macroglobulina, el cual es un dímero unido por puentes disulfuro, con subunidades de 190 kDa (Hergenhahn y cols. 1988) y el otro es un inhibidor de tripsina de 155 kDa (Hergenhahn y cols. 1987). Posteriormente se encontró que de estos dos inhibidores, el de tipo tripsina de 155 kDa, es el más eficiente para bloquear la actividad de la ppA en el acocil Pacifastacus leniusculus (Aspán y cols. 1990b). Un tercer inhibidor (el cual no presentó actividad sobre el sistema de la proPO) se purificó de los hemocitos del acocil Astacus astacus, el cual inhibe subtilisinas y presenta un peso molecular de 23 kDa. Este inhibidor también actúa sobre una proteasa del hongo Aphanomyces astaci, la cual participa durante la infección en los crustáceos por éste hongo (Häll y Söderhäll 1982).

De esta manera, se tiene que el sistema de la proPO puede reconocer moléculas extrañas, ser activado, amplificado y regulado; lo que lo hace muy similar a otros sistemas de

activación, como lo son el sistema complemento, ²² el
fibrinolítico y el de coagulación en vertebrados (Fig. 1).

6. JUSTIFICACION

El presente trabajo se realizó con el propósito de dar una aportación al conocimiento de la respuesta inmunitaria de invertebrados, y en particular de los crustáceos.

Como analizamos previamente, el sistema de la profenoloxidasa es de vital importancia dentro de los mecanismos inmunológicos de los crustáceos; participa en todos los eventos celulares que se dan en el organismo ante una invasión de agentes extraños, o en heridas que se pudieran presentar. Es propuesto como un posible antecesor de la vía alterna del sistema de complemento en mamíferos, de lo cual destaca la importancia de estudiar y conocer sus mecanismos de activación y regulación.

Se decidió utilizar como modelo experimental al acocil Procambarus clarki, debido a su resistencia en condiciones de laboratorio, ya que no necesita medios especiales para su mantenimiento. Además, esta especie ha sido muy utilizada en trabajos enfocados a neurofisiología, lo que podría ayudar a explicar algunos resultados de este trabajo.

Por otra parte, el estudio de los mecanismos de defensa en los crustáceos puede redundar en la aportación de conocimientos aplicativos contra las enfermedades de estos organismos, sobre todo en lo que concierne a la industria camaronera.

OBJETIVOS.**GENERALES.**

- a) Iniciar el estudio del sistema de la profenoloxidasa (proPO), en el acocil Procambarus clarki.

PARTICULARES.

- a) Evidenciar la presencia del sistema de la proPO en células sanguíneas de P. clarki.
- b) Obtener el sistema de la proPO en forma inactiva a partir de lisados de hemocitos.
- c) Caracterizar parcialmente a las moléculas involucradas dentro de este sistema.

7. MATERIAL Y METODOS.

7.1. ORGANISMOS. ORIGEN Y MANTENIMIENTO.

Los organismos empleados fueron adultos de la especie Procambarus clarki, los cuales se encontraban en la fase 3 de intermuda. Fueron colectados en el río Conchos, en el Estado de Chihuahua y se mantuvieron en estanques con agua corriente, con ciclos naturales de luz-oscuridad, alimentándose una vez por semana con alimento para langostinos, elaborado a base de cabeza de camarón y harina de pescado.

7.2. OBTENCION DE LA HEMOLINFA.

La hemolinfa se obtuvo por punción pericárdica de la región dorsal del acocil, con una jeringa de insulina de 1 ml, conteniendo 0.1 ml de anticoagulante de citratos/EDTA frío (NaCl 0.45 M, glucosa 0.1 M, Citrato de sodio 0.03 M, Ac. cítrico 0.026 M, EDTA 0.01 M; pH 4.6) (Söderhäll y Smith 1983). La jeringa se llevó a 1 ml con la hemolinfa. Se trabajó todo el tiempo en frío manteniendo las soluciones en hielo húmedo.

7.3. DETERMINACION CITOQUIMICA DEL SISTEMA DE LA proPO.

a). CINETICA DE ADHERENCIA CELULAR AL VIDRIO.

Cubreobjetos previamente desengrasados, se cubrieron con 75 μ l de la hemolinfa obtenida y mezclada con 2 ml de sol. salina para crustáceos dulceacuícolas (SSC: NaCl 200 mM, KCl 5.36 mM, MgCl₂, NaHCO₃ 2.38 mM, CaCl₂ 13.5 mM; pH 7.4)

(Van Harreveld 1936). Se incubaron en cajas multipozos estériles a temperatura ambiente por duplicado durante 2 h. Cada 10 min. se lavaron 2 cubreobjetos con SSC (teniendo cuidado de no tocar la superficie superior donde se adhirieron las células), se fijaron y se incluyeron en resina sintética. Se observaron al microscopio óptico (10 X) y se contó el número de células adheridas en tres campos distintos.

b). INCUBACION DE HEMOCITOS CON L-DOPA.

Se permitió la adherencia de los hemocitos durante 50 min. a temperatura ambiente (de acuerdo a la cinética de adherencia celular). Después de este tiempo se lavaron con SSC para eliminar las células no adheridas. Se fijaron con glutaraldéhidro al 1 % (preparado en cacodilatos de sodio 0.1 M, pH 7.0) durante 30 min. y se lavaron con SSC para eliminar el exceso de glutaraldéhidro. Las preparaciones se cubrieron con L-DOPA (4 mg/ml) diluida 1:4 en SSC y fueron incubadas a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad durante 24 h. Cada 2 h se lavaron un par de cubreobjetos para ser observados al microscopio óptico (40 X). Se contaron 3 campos por preparación en los que se distinguieron los tipos celulares y la marca oscura de actividad de fenoloxidasas.

c). INCUBACION DE HEMOCITOS CON L-DOPA OXIDADA.

Las células adheridas fueron cubiertas con L-DOPA (4 mg/ml), la cual fue previamente oxidada por exposición a la luz por 24 h. Las preparaciones se incubaron a temperatura ambiente durante 14, 16, 18 y 20 h. Para cada tiempo,

después de lavar el exceso de L-DOPA oxidada, se contaron 3 campos por preparación diferenciando los tipos celulares presentes y cuales presentaron la marca oscura.

7.4. OBTENCION DEL SISTEMA DE LA proPO EN EL SOBRENADANTE DE LISADOS DE HEMOCITOS (SLH).

a). OBTENCION DEL SLH CON MACERADOR CELULAR.

La hemolinfa se obtuvo de 14 acociles en anticoagulante de citratos/EDTA y se centrifugó a 200 g (Fuerza Centrifuga Relativa) durante 2 min., se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de Amortiguador I (CaCl_2 100 mM y Cacodilato de sodio 10 mM; pH 7.0) (Smith y Söderhäll 1983b). Se homogenizó mediante 10 golpes con el macerador celular (todo se realizó en frío utilizando hielo). El homogenizado se ultracentrifugó a 60000 g durante 30 min. Se recuperó el sobrenadante y se midió su actividad de fenoloxidasa.

b). OBTENCION DEL SLH CON DETERGENTE NP-40.

Se obtuvo la hemolinfa de 14 acociles y se centrifugó a 200 g. La pastilla celular fue resuspendida en Amortiguador I, el cual contenía 0.05 % de detergente NP-40. Se incubaron durante 10 min en hielo agitando en vortex cada 2 min. Se centrifugó nuevamente a 7100 g durante 10 min y se recuperó el sobrenadante que después fue utilizado como fuente enzimática de proPO.

c). OBTENCION DEL SLH POR CICLOS DE CONGELAMIENTO/DESCONGELAMIENTO.

La hemolinfa de 2 acociles, se centrifugó a 200 g por 2

min, el sobrenadante se eliminó y el paquete celular fue lavado una vez con 1 ml. de Amortiguador I. Se centrifugó nuevamente a 200 g y la pastilla fue resuspendida en 100 μ l de Amortiguador II (Amortiguador I con 10 % de glicerol). Las muestras se sometieron a 6 ciclos de congelamiento-descongelamiento en acetona con hielo seco y baño María a 37 °C y se centrifugaron a 7100 g. El sobrenadante fue empleado para ensayos de actividad de PD (fenoloxidasas).

d). OBTENCION DEL SLH POR SONICADO.

La hemolinfa de 6 acociles se centrifugó a 200 g y la pastilla celular fue resuspendida en 1 ml de Amortiguador I. La suspensión celular se sometió a 10 min en el sonicador a 50 KCS (kilociclos por segundo) y se centrifugó a 7100 g. El sobrenadante fue utilizado para ensayos de PD.

PROTEINA. La concentración de proteína en los lisados fue determinada por el método de Bradford (Bradford 1976), con albúmina sérica bovina como estándar.

7.5. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA (PO).

Para este ensayo fue utilizado el SLH obtenido por congelamiento-descongelamiento, a una concentración de 2 mg/ml de proteína. A 50 μ l del SLH le fueron agregados 50 μ l del activador (carbohidrato, Apéndice I). Esta mezcla se incubó a 37 °C en baño durante 30 min. Después de este tiempo se agregaron 25 μ l de L-DOPA (4 mg/ml) y se incubó 20 min a temperatura ambiente. La reacción fue detenida agregando 500 μ l de Amortiguador I frío y se midió la densidad óptica a 490 nm. La actividad enzimática fue

expresada en unidades/mg de proteína/min., donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento en la absorbancia de 0.001/min./mg de proteína (Smith y Söderhäll 1983).

7.6. EFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO.

A 45 μ l del SLH le fueron agregados 5 μ l del inhibidor (quedando en la mezcla de reacción a una concentración de 10 mM, excepto para la leupeptina que quedó a 0.5 mM) (Apéndice II) posteriormente se incubó a 37 °C durante 2 min. A la mezcla se le agregó un volumen de 50 μ l de Zs (5 μ g. eq. de gluc./ml) o LPS (20 μ g/ml) y se prosiguió con el ensayo de fenoloxidasas previamente descrito.

7.7. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 15 % (Laemmli 1970).

A 50 μ l de SLH (2 mg/ml de proteína), se le agregaron 50 μ l de la solución de zimosán (5 μ g. eq. de gluc./ml) o 50 μ l de LPS (20 μ g/ml), 2 μ l de PTU 10 mM (preparada en dimetilformamida al 50 %) y 5 μ l de inhibidor de proteasas (Apéndice II). Se incubaron a 37 °C durante 30 min. Se tomaron 20 μ l de esta mezcla y se les adicionó 5 μ l de buffer de muestra (el cual contenía 5 % de β -mercaptoetanol). Las muestras fueron sometidas durante durante 3 min a ebullición en baño y después de enfriarlas, se colocaron en los pozos del gel (en cada muestra 20 μ g de proteína) y fueron corridas a voltaje constante de 60 V en el gel concentrador y de 100 V en el gel separador. Los geles fueron teñidos durante toda

la noche con azul brillante de Coomassie R 250.

B. RESULTADOS.

El presente trabajo se realizó con el propósito de estudiar el sistema de la proPO en el acocil P. clarki, para lo cual se decidió comenzar por evidenciar la presencia del sistema en las células sanguíneas del acocil.

B.1. DETERMINACION CITOQUIMICA DEL SISTEMA DE LA proPO EN LOS HEMOCITOS DE P. clarki.

Para lograr evidenciar el sistema de la proPO en las células sanguíneas (hemocitos), fueron realizados ensayos citoquímicos en células adheridas a cubreobjetos. Se elaboró una cinética de adherencia celular al vidrio, para obtener el tiempo donde se encontraba el mayor número de células adheridas. Los resultados mostraron que a los 50 min. se presentó el mayor número de células adheridas, pero a los 60 min. disminuye drásticamente. Por tal motivo, se consideró que 50 min. es el tiempo más adecuado para encontrar un buen número de células, con un promedio de 480 células por campo (Fig. 2). Así mismo, se observó que en la hemolinfa del acocil P. clarki se encuentran 3 subpoblaciones de hemocitos circulantes: hialinos, granulares y subgranulares (Fig. 3); lo cual corresponde con lo previamente reportado para otros decapodos (Söderhäll y Smith 1983, Smith y Söderhäll 1983a, Smith y Söderhäll 1983b) y recientemente también para P. clarki (Lanz y cols. 1992).

Para evidenciar la presencia del sistema de la proPO,

utilizamos la L-DOPA, puesto que puede ser utilizada como sustrato por la enzima activa fenoloxidasa (Söderhäll y Ajaxon 1982). Las observaciones realizadas, mostraron que sólo las células granulares y subgranulares presentaron la marca oscura de actividad de fenoloxidasa (Fig. 4), donde el porcentaje de células marcadas se incrementó con el tiempo, el cual llegó a su máximo a las 14 h (Fig. 5). Estos resultados fueron similares a los encontrados previamente en otros decápodos (Söderhäll y Smith 1983, Johansson y Söderhäll 1989a), en los que se ha determinado el sistema de la proPO en los hemocitos granulares y semigranulares. Por otra parte, al tratar a las células con L-DOPA oxidada no se observó marca lo que corroboró la especificidad de la reacción.

8.2. OBTENCION DEL SISTEMA DE LA proPO EN EL SOBRENADANTE DE LISADOS DE HEMOCITOS (SLH) POR CONGELAMIENTO/DESCONGELAMIENTO Y ACTIVIDAD DE FENOLOXIDASA (PO).

Para continuar el análisis del sistema de la proPO, fue necesario encontrar un método que nos permitiera su recuperación a partir de los hemocitos y que al mismo tiempo no se encontrara activado, por lo que fueron empleadas distintas técnicas de lisis celular. La que ha sido utilizada con mayor frecuencia es la técnica con macerador de células (Potter) (Söderhäll y Unestam 1979, Söderhäll y Smith 1983, Smith y Söderhäll 1983b, Söderhäll 1983, Ashida y Söderhäll 1984, Söderhäll y Häll 1984). Sin embargo, en nuestro estudio no dió resultados, puesto que siempre se encontró

autoactivado el sistema de la proPO. En los lisados obtenidos por sonicado de los hemocitos nunca se encontró actividad enzimática, ni al agregar β -1,3 glucano. Por el contrario, cuando se empleó la técnica con NP-40 (que es un detergente suave), el sobrenadante (SLH) obtenido presentó una actividad enzimática basal de fenoloxidasas muy elevada debido probablemente a la autoactivación del mismo.

La obtención del SLH en las condiciones más apropiadas fue posible mediante ciclos de congelamiento-descongelamiento. Se lograron niveles basales de actividad por debajo de lo esperado (D.O. a 490 nm = 0.03), e incluso menores a los encontrados en otros crustáceos (Söderhäll y Unestam 1979, Söderhäll y Smith 1983, Smith y Söderhäll 1983a, Smith y Söderhäll 1983b, Ashida y Söderhäll 1984, Johansson y Söderhäll 1985) y a su vez factibles de ser activados, con lecturas de D.O. superiores a 1.0 (Tabla II).

8.3. ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO CON DIFERENTES CARBOHIDRATOS.

Se ha reportado que el sistema de la proPO puede ser activado por componentes de la pared celular microbiana (Johansson y Söderhäll 1989a), tales como el β -1,3 glucano y el LPS. Para observar la especificidad del sistema, fueron probados distintos carbohidratos con resultados diferentes (Tabla I). Los únicos carbohidratos que lograron activar el sistema fueron el LPS y el zimosán. Por el contrario, se ha reportado a la laminarina (polímero de β -1,3 glucano) como un buen activador del sistema de la proPO en otros crustáceos

(Söderhäll 1983, Smith y Söderhäll 1983b, Johansson y Söderhäll 1985), pero en nuestros lisados no pudo ser reconocida de una manera eficiente.

En la tabla II se encuentran representadas las unidades enzimáticas obtenidas con el zimosán y el LPS, por lo que fue necesaria la elaboración de curvas de concentración del activador para encontrar el punto óptimo de activación (concentración a la cual el sistema es activado de manera más eficiente) y así poder evaluar de manera cuantitativa la actividad de fenoloxidasa.

a) CURVAS DE ACTIVACION CON LIPOPOLISACARIDO (LPS) Y ZIMOSAN (Zs).

El SLH (2 mg/ml de proteína) tratado con LPS presentó una máxima actividad a una concentración de 20 µg/ml (con 278 U; Fig. 6). Sin embargo, aún a concentraciones de 1 µg/ml se encontró actividad. Así mismo, se ha mencionado por otros autores (Söderhäll y Häll 1984), que el sistema de la proPO puede ser inhibido por concentraciones elevadas de LPS y en *P. clarki* se encontró el mismo resultado (Fig. 6), lo que nos sugiere que las lecturas espectrofotométricas son el resultado de la actividad de fenoloxidasa.

Por otro lado, debido a que el zimosán es un polímero compuesto únicamente a base de unidades de glucosa, se decidió trabajarlo de manera cuantitativa. Se modificó el método del tetrazolio descrito por Fairbridge y cols. (1951), y se realizó un análisis de glucosa (ver apéndice III) para expresar la concentración de Zs en µg equivalentes de

glucosa/ml.

En la Fig. 7 se presentan los resultados de los ensayos de PD realizados con Zs, donde se logró detectar actividad enzimática en el SLH (2 mg/ml de proteína) desde una concentración de Zs de 0.0001 µg eq. de gluc./ml, siendo a 5 µg eq. de gluc./ml la concentración en la cual se presenta una máxima actividad de PD con 524 U. Así mismo, se observó que al igual que el LPS, el Zs a elevadas concentraciones es capaz de inhibir la activación del sistema, quedando casi bloqueada a 50 µg eq. de gluc./ml.

8.4. EFECTO DE INHIBIDORES DE PROTEASAS EN LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPD.

Se encuentra claramente establecido que la cascada proteolítica del sistema de la proPD se desencadena al ser activada una enzima del tipo de las serina proteasas llamada proteína activadora de la profenoloxidasa (ppA) (Johansson y Söderhäll 1989a, Söderhäll y cols. 1990, Aspán y cols. 1990a, Aspan y cols. 1990b, Aspán y cols. 1991). En nuestro estudio se utilizaron inhibidores de serina proteasas y de cisteín proteasas para analizar su efecto sobre la activación del sistema.

Los resultados mostraron que la activación del sistema de la proPD, pudo ser disminuida por inhibidores de serina proteasas (PMSF, LUE y STI). El más eficiente fue el inhibidor de tripsina de soya, el cual inhibió totalmente la actividad de PD (Figs. 8 y 9). Sin embargo, encontramos que inhibidores de cisteín proteasas (N-E, N-M y IAM) promueven

un incremento en la actividad de PO, que para el caso del LPS fue de 108, 79 y 28 % respectivamente y cuando se activó con zimosán fue de 24, 38 y 10 % respectivamente (Figs. 8 y 9).

Cuando a el lisado no le es agregado activador (LPS o Zs), los inhibidores de cisteín proteasas no muestran el efecto de incrementar la actividad de PO. Por otra parte, al incubar el SLH con zimosán y la mezcla de inhibidores (STI + inhibidores de cisteín proteasas) tampoco se observó actividad de PO (Fig. 10). El mismo efecto se presentó con LPS.

8.5. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Los resultados observados en los ensayos de PO sugieren la presencia de moléculas del sistema de la proPO involucradas en su activación por el LPS y el Zs. Esto nos llevó a la realización de corrimientos electroforéticos de lisados activados y e inhibidos para observar el patrón de proteínas y los cambios que sufre.

En todos los geles se presentó un patrón de proteínas complejo, en el cual se observaron proteínas de alto y bajo peso molecular. En todos los ensayos se observó la presencia de una banda de aproximadamente 70 KDa que, por el peso molecular, probablemente se trate de hemocianina.

En los lisados sin activar se observó un grupo de proteínas de aproximadamente 41, 39 y 37 kDa que sufrieron modificaciones cuando los lisados fueron activados con zymosan y LPS (Figs. 11 y 12). Durante la activación del SLH se vieron afectadas las proteínas anteriores y

aparecieron otras moléculas de aproximadamente 42.5, 38 y 33.5 kDa. Cuando el SLH fue incubado en presencia de STI, las bandas no se modificaron, aún en presencia de Zs. Así mismo, se encontró que cuando el SLH es activado previamente, ya no es posible inhibirlo (Fig. 11, carril 10). La diferencia en los patrones electroforéticos al activar con Zs o con LPS, es que con Zs los cambios se presentan más rápido.

En el corrimiento electroforético de las muestras tratadas con los inhibidores (Fig 12), el STI y el PMSF mostraron el mismo efecto de inhibición observado con anterioridad; mientras que con leupeptina sólo la banda de aproximadamente 41 KDa fue afectada y se presentó la de 42.5 KDa. En los 3 últimos carriles (que contienen inhibidores de cistein proteasas), no se modificó la banda de 41 KDa. Las bandas de aproximadamente 39 y 37 KDa fueron afectadas y se evidenció la presencia de las bandas de aproximadamente 38 y 33.5 KDa. Los resultados fueron similares con ambos activadores (Zs y LPS).

9. DISCUSION.

El estudio de los mecanismos inmunológicos en los crustáceos es de vital importancia en países que presentan una industria de cultivo de camarón y langostino en pleno desarrollo y donde, debido a la falta de información y conocimiento de los mecanismos inmunes de estos organismos, no se han logrado elaborar técnicas y tratamientos adecuados contra las enfermedades (Universidad de Sonora 1985, Bautista 1988, Ramírez 1988, Bonami 1992).

Debido a la importancia del sistema de la profenoloxidasasa (proPO) en los mecanismos inmunológicos de los crustáceos (Johansson y Söderhäll 1989), hemos iniciado su estudio utilizando como modelo experimental al acocil P. clarki

Las subpoblaciones granulares y subgranulares de hemocitos, presentaron reacción positiva a la L-DOPA, lo que sugiere la presencia del sistema de la proPO en éstos 2 tipos celulares. Las células hialinas no mostraron reacción con la L-DOPA (Fig. 4 y Fig. 5). Söderhäll y Smith (1983), al separar las 3 subpoblaciones de hemocitos presentes en la hemolinfa de Carcinus maenas observaron que el sistema de la proPO se localiza en los gránulos de las células granulares y semigranulares. En el caso de P. clarki es difícil decidir si la marca se encuentra en los gránulos, pero si es evidente que todo el citoplasma de la célula se encuentra marcado. En

la Fig. 5 se observa que las células granulares se marcan de manera más rápida que las subgranulares, probablemente debido a que las granulares tienen una mayor cantidad del sistema de la proPO por presentar gránulos de mayor tamaño. Johansson y Söderhäll (1989) proponen a las células granulares como importantes reservorios del sistema de la proPO.

La obtención del sobrenadante de lisados de hemocitos en las condiciones apropiadas para su manipulación, presentó diferentes complicaciones. Por un lado, el empleo de la técnica con macerador celular, el cual ha sido muy utilizado para lisar células de crustáceos (Smith y Söderhäll 1983a, Smith y Söderhäll 1983b, Söderhäll y Smith 1983, Söderhäll 1983, Söderhäll y Häll 1984, Leonard y cols. 1985), no dió resultados durante nuestros experimentos, puesto que en general el sistema se encontró autoactivado.

Los lisados obtenidos con NP-40 mostraron el mismo problema de autoactivación, pero probablemente se debió al mismo detergente, ya que se ha reportado que los solventes orgánicos al igual que los detergentes y el calor son capaces de promover la activación del sistema de la proPO por cambios conformacionales en las moléculas (Ashida y Söderhäll 1984).

Por el contrario, los lisados obtenidos por sonicado de los hemocitos no presentaron actividad enzimática aún en presencia de β -1,3 glucano. Es posible que las células no se lisaran adecuadamente, ya que al comenzar el tratamiento con el sonicador se formaron agregados celulares que no se disgregaron.

La estrategia para la obtención del lisado en las condiciones más apropiadas fue mediante ciclos de congelamiento/descongelamiento. En este caso, aún cuando al resuspender los hemocitos en el amortiguador de lisis se llegaron a formar agregados celulares, el congelamiento y descongelamiento permitió observar la disgregación de los mismos. Al colocar el SLH solamente en presencia de L-DOPA no se observó actividad de PO, la cual si se logró inducir al agregarle β -1,3 glucano.

En nuestro estudio, al igual que en otros trabajos (Söderhäll y Häll 1984, Johansson y Söderhäll 1988, Ashida y Yoshida 1988, Johansson y Söderhäll 1989a, Johansson y Söderhäll 1989b), la concentración de calcio fue determinante para la obtención del SLH en forma inactiva, logrando observar que a bajas concentraciones de calcio (5mM) el sistema es activado, siendo 100 mM la concentración adecuada para evitar la autoactivación.

Los resultados sobre la activación por diferentes carbohidratos mostraron que el sistema de la proPO pudo ser activado específicamente por el β -1,3 glucano y el LPS. La heparina, galactosamina y glucosamina (quitina), que también contienen glucosa, no fueron capaces de activar el sistema, con lo que se demostró la especificidad del mismo.

La curva de activación realizada con LPS mostró que a concentraciones de 1 μ g/ml el sistema de la proPO fue activado, y a elevadas concentraciones se inhibe su activación (500 μ g/ml) (Fig. 6). Estos resultados son muy

importantes y nos sugieren que en nuestros lisados las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro fueron el resultado de la actividad de fenoloxidasa. Resultados similares se han reportado en otros crustáceos (Söderhäll y Häll 1984) y en sistemas de activación enzimática, donde es característica la inhibición por saturación.

El zimósán (β -1,3 glucano) también se ha reportado como un activador importante del sistema de la proPO (Söderhäll y Unestam 1979, Söderhäll y cols. 1979, Ashida y Söderhäll 1984, Johansson y Söderhäll 1989). En el caso de P. clarki, el Zs de la pared celular de Sacharomyces cerevisiae, fue el que dió mejores resultados. De la misma manera que con el LPS, el Zs fue capaz de inhibir la activación del sistema a altas concentraciones, lo que nos hace pensar que el sistema pudo ser bloqueado por la saturación del mismo, al igual que ocurrió con LPS (Söderhäll y Häll 1984).

Por otra parte, estos resultados pueden explicar, la resistencia que tiene ésta especie a enfermedades de origen fúngico o bacteriano. Bautista (1988), reporta al acocil P. clarki resistente a infecciones causadas por el hongo Aphanomyces astaci.

Por el contrario, la laminarina (polímero de β -1,3 glucano de Laminaria digitata) que ha sido utilizada en diferentes trabajos y en algunos de ellos se ha encontrado como un buen activador del sistema de la proPO (Söderhäll y Unestam 1979, Smith y Söderhäll 1983b, Smith y cols. 1984, Johansson y Söderhäll 1985), no mostró ser un buen activador

del sistema de la proPO en P. clarki, debido probablemente a que la preparación de la laminarina no fue la más adecuada. Lackie (1988b), menciona que el mejor reconocimiento o afinidad hacia cierto carbohidrato se encuentra en función de la especie. Por ejemplo, la laminarina es un buen activador de lisados de hemocitos de Schistocera sp. y del de algunos crustáceos y no así del de Periplaneta sp. En el caso de otros insectos, el sistema de la proPO no es activado por LPS bacteriano (Leonard y cols. 1985) y sólo algunos peptidoglicanos activan el sistema en Bombyx mori (Yoshida y Ashida 1986).

Los ensayos de inhibición mostraron resultados similares para ambos activadores (LPS y Zs) (Figs. 8 y 9). Por un lado, los inhibidores de serina proteasas (STI, LUE y PMSF) disminuyeron la actividad de PO en diferente grado, siendo el STI el más efectivo (bloquea totalmente la actividad). Este resultado nos sugiere la participación de una proteasa del tipo de las serinas en la activación del sistema, la cual ya se ha propuesto por otros investigadores (Johansson y Söderhäll 1989a, Söderhäll y cols. 1990, Aspán y cols. 1990a, Aspán y cols. 1990b, Aspán y Söderhäll 1991). Sin embargo el aumento en la actividad de PO observada con los inhibidores de cisteín proteasas (N-E, N-M y IAM) es interesante y nos sugiere la existencia de moléculas o sistemas sensibles a estos inhibidores que pudiera participar en la regulación del sistema de la proPO.

Cuando se incubó el SLH con la mezcla de STI y los

inhibidores de cisteín proteasas no se observó actividad (Fig. 10), sugiriendo la necesidad de que el lisado se encuentre activado de manera previa para que se pueda observar el efecto de los inhibidores de cisteín proteasas.

Para tratar de analizar mejor estos procesos, se elaboraron geles de poliacrilamida del lisado activado e inhibido, para observar las moléculas que pudieran estar involucradas y los cambios que sufrieron.

En los lisados migrados electroferéticamente, destaca la presencia de una banda de aproximadamente 70 kDa, que presumiblemente creemos se trate de hemocianina, ya que al migrar una muestra de plasma, apareció esta misma banda y por debajo de ella no se observó a las demás moléculas que se presentaron en los lisados celulares (Figura no mostrada). En un lisado inactivo se presentaron tres polipéptidos que nos parecieron interesantes por verse afectados al ser activado el sistema de la proPD, con pesos moleculares de 41, 39 y 37 KDa.

En las figuras 11 y 12 se observó un patrón similar de moléculas al ser activado el SLH con Zs o con LPS, y la diferencia entre ambos activadores, sólo se observó en la rapidez con la cual se dieron los cambios en el patrón electroforético. El tiempo de aparición de las moléculas de 42.5, 38 y 33.5 KDa al activar con Zs, puede complementar lo observado en los ensayos de PD, donde se observó una mayor actividad al incubar con Zs. Esto sugiere que el sistema de la proPD presenta una mayor afinidad por el Zs en *P. clarki*,

lo que podría explicar en parte, la resistencia a las invasiones por hongos ya mencionadas, o las diferencias en cuanto a reconocimiento de diferentes carbohidratos mencionadas por Lackie (1988b).

Cuando se colocaron las muestras con inhibidores (fig. 13), se observó que el STI al igual que el PMSF, no permitió la desaparición de las moléculas de 41, 39 y 37 KDa y por tanto no aparecen las de 42.5, 38 y 33.5 KDa. Por su parte la LEU conserva las bandas de 39 y 37 KDa y no la de 41 KDa, lo que sugiere que la banda de 41 KDa, además de no pertenecer al grupo de las serina proteasas, pudo ser modificada por la presencia de Zs. Los inhibidores para cisteín proteasas previnieron la desaparición de la molécula de 41 kDa y la aparición de la de 42.5 kDa, pero se modificaron las moléculas de 39 y 37 kDa y aparecieron las de 38 y 33.5 kDa, lo que sugiere que estas dos últimas moléculas (39 y 37 kDa), además de tratarse posiblemente de serinas proteasas, se encuentran relacionadas con la activación del sistema. Aspán y cols. (1990a), encuentran que la proteína activadora de la proPD (ppA) de P. leniusculus, presenta un peso molecular de 36 KDa, el cual es muy aproximado al observado en dos moléculas de P. clarki (39 y 37 kDa).

Por otra parte, todo proceso de activación que continúe con una cascada proteolítica, debe necesariamente incorporar inhibidores que regulen el sistema. Por ejemplo, en el plasma de mamíferos, se encuentran factores como el I y el H que controlan la producción de C3-convertasa en la vía

alterna del complemento y así evitan activaciones innecesarias de este sistema (Lackie 1988b).

En cuanto a moléculas reguladoras, del plasma de P. leniusculus se han aislado y purificado 2; un inhibidor de tripsinas con un peso molecular de 155 KDa (Hergenhahn y cols 1987) y la α_2 -macroglobulina, el cual es un dímero con 190 kDa por subunidad (Hergenhahn y cols. 1988). Pero como ya se describió, estos inhibidores se localizan en el plasma y no dentro de las células. El mecanismo que hemos observado en P. clarki, sensible a inhibidores de cisteín proteasas, posiblemente se trate de un mecanismo regulador del sistema de la proPO, el cual se localiza dentro de los hemocitos. Sin embargo, para conocer su exacta participación dentro de la cascada enzimática de la proPO, es necesaria la realización de investigaciones más detalladas que incluyan la purificación de éstas moléculas.

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, fue posible elaborar las siguientes conclusiones:

1) El sistema de la proPO se localiza en los hemocitos granulares y subgranulares en el acocil P. clarki.

2) Por medio del congelamiento y descongelamiento celular, es posible la obtención del sistema de la proPO de los hemocitos de P. clarki.

3) El sistema de la proPO se activó específicamente por el zimósán (Zs) o por lipopolisacárido (LPS).

4) Durante la activación del sistema de la proPO, es probable la participación de una enzima del tipo de las serina-proteasas de aproximadamente 39 o 37 kDa.

5) La actividad de fenoloxidasa pudo ser incrementada en presencia de inhibidores de cisteín-proteasas.

6) Probablemente una molécula de 41 kDa que es bloqueada por inhibidores de cisteín-proteasas, se encuentre relacionada con la regulación del sistema de la proPO en P. clarki.

11. BIBLIOGRAFIA.

- Acuavisión (1986). El cultivo del camarón en México. Fondepesca Méx. 4: 4-8.
- Armijo, A.O. (1992). Situación actual e importancia comercial del cultivo de crustáceos en México. Inst. Nal. de Pesca. Memorias. "1 Curso Internacional Sobre Enfermedades de Crustáceos y Técnicas Actuales para su Diagnóstico". U.N.A.M.
- Ashida, M. (1971). Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm, Bombyx mori. Arch. Biochem. Biophys., 144: 749-762.
- Ashida, M. y Söderhäll, K. (1984). The prophenoloxidase activation system in crayfish. Comp. Biochem. Physiol., 77B: 21-26.
- Ashida, M. y Yoshida, H. (1988). Limited proteolysis of prophenoloxidase during activation by microbial products in insect plasma and effect of phenoloxidase on electrophoretic mobilities of plasma proteins. Insect. Biochem. 18: 11-19.
- Aspán, A.; Sturtevant, J.; Smith, V. y Söderhäll, K. (1990a). Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. Insect. Biochem., 20: 709-718.

- Aspán, M.; Hall M. y Söderhäll, K. (1990b). The effect of endogenous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. *Insect. Biochem.*, **20**: 485-492.
- Aspán, M. y Söderhäll, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect. Biochem.*, **21**: 363-373.
- Bang, F. (1966). Serologic response in a marine worm, Sipunculus nodus. *Journal of Immunology.*, **96**: 960-971.
- Bang, F. (1983). Crustacean disease responses. En: Bliss, D.E. *The Biology of crustacea pathobiology*. V.6; Academic Press Inc. N.Y., USA. p.p. 130-147.
- Barnes, R.D. (1987). *Zoología de los invertebrados*. 4a ed., Edt. Interamericana, México. p.p. 749-838.
- Bautista, P.C. (1988). *Crustáceos: Tecnología de cultivo*. Edt. Mundi-Prensa. Madrid, España. p.p. 613-644.
- Boman, H.G. y Hultmark, D. (1987). Cell-Free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 103-126.
- Bonami, J.R. (1992). *Primer curso internacional sobre enfermedades de crustáceos y técnicas actuales para su diagnóstico*. Memorias; U.N.A.M., México.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brick, R.W. y Davis, J.T. (1987). *El cultivo del langostino*.

Fondepesca, Extensionismo. FOEXT/B1/87.

- Cooper, E.L. (1981). Immunity in invertebrates. Critical Reviews in Immunology. 2: 1-32.
- Cooper, E.L. (1984). Presence of β -2-microglobulin-like structure expressed on the membrane of some leukocytes from several earth-worms. Proceedings 2 International Congress of ISDCI. Los Angeles. U.S.A., 1983
- Cooper, E.L.; Rinkevich, B.; Uhlenbruck, G. y Valembos, P. (1992). Invertebrate Immunity: Another Viewpoint. Scand. J. Immunol. 35: 247-266.
- Durliat, M. y Vranckx, R. (1981). Action of various anticoagulants on hemolymphs of lobsters and spiny lobsters. Biol. Bull. 160: 55-68.
- Durliat, M. (1985). Clotting processes in crustacea Decapoda. Biol. Rev. 60: 473-498.
- Duvic, B. y Söderhäll, K. (1990). Purification and characterization the α β -1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish Pacifastacus leniusculus. J. Biol. Chem., 265: 9327-9332.
- Fairbridge, R.A.; Willis, K.J. y Booth, R.G. (1951). The direct colorimetric estimation of reducing sugars and other reducing substances with tetrazolium salts. Biochem J. 49: 423.
- Galindo, J.; Pedreño, E.; García-Carmona, F.; García-Cánovas, F.; Solano, F. y Lozano, J. (1983). Steady-State Study of the Mechanism of Dopa-Oxidase activity of Tyrosinase. Int. J. Biochem. , 15: 1455-1461.

- Grassé, P.P. (1985). Zoología. Vol.1, Edt. MASSON., Barcelona, España., p.p. 93-125.
- Häll, L. y Söderhäll, K. (1982). Purification and properties of a protease inhibitor from crayfish hemolymph. J. Inverteb. Pathol., 39: 29-37.
- Hilgard, H.; Wander, R. y Hinds, W. (1974). Specific receptors in relation to the evolution of immunity. En: Cooper 1974, Contemporary topics in immunobiology. Invertebrate Immunology., Vol.4; Plenum Press, N.Y., USA.
- Hergenbahn, H.-G.; Aspán, A. y Söderhäll, K. (1987). Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenoloxidase activation from crayfish plasma. Biochem. J., 248: 223-228.
- Hergenbahn, H.-G.; Hall, M. y Söderhäll, K. (1988). Purification and characterization of an α_2 -macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish Pacifastacus leniusculus. Biochem. J., 255: 801-806.
- Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. J. Comp. Physiol. 156B: 175-181.
- Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1988). Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. J. Cell Biol. 106: 1795-1803.
- Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1989a). Cellular immunity in Crustacean and the proPD system. Parasitol. Today. 5:

171-176.

- Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1989b). A Cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulation activity towards crayfish granular cells. *Insect. Biochem.* 19: 183-190.
- Kobayashi, M.; Johansson, M.W. y Söderhäll, K. (1990). The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro. *Cell. Tissue. Res.* 260: 13-18.
- Lackie, A.M. (1988a). Immune mechanisms in insects. *Parasitol. Today.* 4: 98-105.
- Lackie, A.M. (1988b). Haemocyte Behaviour. *Advanc. Insect Physiol.* 21: 85-178.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*. 227: 680-685.
- Lanz, H. (1988). "Respuesta inmune humoral del acocil Procambarus clarkii (CRUSTACEA DECAPODA): Análisis de la capacidad aglutinante de su hemolinfa sobre eritrocitos de diversos invertebrados". Tesis Biologo. ENEP-Izt. UNAM, México.
- Lanz, H.; Tsutsumi, V. y Arechiga, H. (1992). Morphological and biochemical characterization of Procambarus clarkii blood cells. *Dev. Comp. Immunol.* (En prensa).
- Lemmi, C.A.; Cooper, E.L. y Moore, T.C. (1974). An Approach to Studying Evolution of Cellular Immunity. En: Cooper 1974, Contemporary topics in immunobiology.

- Invertebrate Immunology., Vol.4; Plenum Press, N.Y., USA.
- Leonard, C.; Söderhäll, K. y Ratcliffe, N.A. (1985). Studies on prophenoloxidase and protease activity of Blaberus craniifer haemocytes. Insect. Biochem. 15: 803-810.
- Llera, E.D. (1984). Temas para un futuro Biólogo. UNAM., México.
- Mckay, D. y Jenkin, C.R. (1969). Immunity in the Invertebrates. II Adaptative Immunity in the crayfish (Paracheraps bicarinatus). Immunology. 17: 127-138.
- Miller, V.H.; Ballback, R.S.; Pauley, G.; y Krassner, S. (1972). A preliminary physicochemical characterization of an agglutinin found in the hemolymph of the crayfish Procambarus clarkii. J. Invert. Pathol. 19: 83-93.
- Nappi, A.J. (1974). Insect hemocytes and the problem of host recognition of foreignness. En: Cooper, E.L. 1974, Contemporary topics in immunobiology. Invertebrate Immunology., Vol.4; Plenum Press, N.Y., USA.
- Persson, V. y Söderhäll, K. (1987). Encapsulation of foreing particles in vitro by separated blood cells from crayfish, Astacus leptodactylus. Cell. Tissue. Res. 247: 409-415.
- Ratcliffe, N.A. y Rowley, A.F. (1979). Role of haemocytes in defense against biological agents. En: Gupta AP(ed) Insect Haemocytes. Cambridge University Press, Cambridge London, N.Y. p.p. 331-414.
- Ramírez, J.B. (1988). El cultivo del camarón. SEPESCA.

Folleto 9.999: 15-25.

- Ravindranath, M.H. y cols. (1985). Purification and characterization of an O-acetyl sialic Acid specific lectin from a marine crab Cancer antennarius. J. Biol. Chem. 260: 8850.
- Secretaria de Pesca (1987). Principales registros técnicos y económicos de las granjas camaroneras en operación. Dir. Gral. de Acuacult. México.
- Secretaria de Pesca (1989). Principales registros técnicos y económicos de las granjas camaroneras en operación. Dir. Gral. de Acuacult. México.
- Sloan, B.; Yocum, C. y Clem, L.W. (1975). Recognition of self from non-self in crustaceans. Nature (London), 258: 521-523.
- Smith, V.J. y Söderhäll, K. (1983a). Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, Astacus astacus by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. Cell Tissue. 233: 295-303.
- Smith, V.J. y Söderhäll, K. (1983b). β -1,3 Glucan activation of crustacean hemocytes in vitro an in vivo. Biol. Bull. 164: 299-314.
- Smith, V.J.; Söderhäll, K. y Hamilton, M. (1984). β -1,3 glucan induced cellular defence reactions in the shore crab Carcinus maenas. Comp. Biochem. Physiol. 77A: 635-639.
- Söderhäll, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and

- melanization - a recognition mechanism of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* **6**: 601-611.
- Söderhäll, K. (1992). Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthropods. *Boll. Zool.* **59**: 141-151.
- Söderhäll, K. (1983). β -1,3-glucan enhancement of protease activity in crayfish hemocyte lysate. *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**: 221-224.
- Söderhäll, K. y Ajaxon, R. (1982). Effect of quinones and melanin on mycelian growth of Aphanomyces ssp. and extracellular protease of Aphanomyces astaci, a parasite on crayfish. *J. Invert. Pathol.* **39**: 105-109.
- Söderhäll, K.; Aspán, A. y Duvic, B. (1990). The proPO-system and proteins; role in cellular communication in arthropods. Cellular and molecular aspects of insect immunity. *Res. Immunol.* **141**: 896-907.
- Söderhäll, K. y Häll, L. (1984). Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Bioch. Bioph. Acta.* **797**: 99-104.
- Söderhäll, K.; Hall, M.; Unestam T. y Nyhlén, L. (1979). Attachment of phenoloxidase to fungal cell walls in arthropod immunity. *J. Invert. Pathol.* **34**: 285-294.
- Söderhäll, K. y Smith, V.J. (1983). Separation of the haemocyte population of Carcinus maenas and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 229-239.

- Söderhäll, K.; Smith, V.J. y Johansson, M.W. (1986).
Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.* **245**: 43-49.
- Söderhäll, K. y Unestam, T. (1979). Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. *Can. J. Microbiol.* **25**: 406-414.
- Tyson, C.J. y Jenkin, C.R. (1973). The importance of opsonic factors in the removal of bacteria from the circulation of the crayfish (Parachaeraps bicarinatus). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **51**: 609.
- Tyson, C.J. y Jenkin, C.R. (1974). The cytotoxic effect of haemocytes from the crayfish Prachaeraps bicarinatus on tumor cells of vertebrates. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **52**: 915-923.
- Unestam, T. y Nyhlén, L. (1974). Cellular and noncellular recognition of and reactions to fungi in crayfish. En: Cooper 1974, Contemporary topics in immunobiology. *Invertebrate Immunology.*, Vol.4; Plenum Press, N.Y., USA.
- Universidad de Sonora (1985). El cultivo del camarón azul Penaeus stylirostris. Centro de Investigación Científica y Tecnológica. México., p.p. 88-107.
- Van Harreveld, A. (1936). A physiological solution for fresh-water crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **34**: 428-

436.

- Vargas, A.F. (1992). Sistema de defensa del camarón café (Penaeus californiensis). Tesis Doctorado. UACP y P del CCH., I.I.B., UNAM. México.
- Vazquez, L.; Lanz, H.; García, F.; Mondragón, J.; Vargas, F.; Montaña, L. y Zenteno, E. (1988). Especificidad de las aglutininas de los crustáceos de agua dulce por ácido siálico. "XVII Congreso Nacional de Bioquímica". Oaxaca, México.
- Vazquez, L.; Maldonado, G. y Zenteno, E. (1991). Caracterización química de la lectina del langostino Macrobrachium rosenbergii. Memorias. "IX Congreso Nacional de Inmunología". U.A.N.L., Monterrey, N.L.
- Yoshida, H. y Ashida, M. (1986). Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, Bombyx mori. Insect. Biochem. 16: 539-545.

12. APENDICES

APENDICE I

SOLUCIONES DE CARBOHIDRATOS (2 mg/ml)

Los carbohidratos utilizados fueron: Laminarina (Laminaria digitata), Lipopolisacarido (E. coli 0111:B4), Zimosán (de Sacharomyces cereviciae), Heparina, galactosamina y glucosamina (SIGMA).

Se pesaron 20 mg. de cada uno (excepto zimosán), y se colocaron en 10 ml. de amortiguador de cacodilato de sodio. Se colocaron en alicuotas de 0.5 ml. en tubos para microfuga estériles y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Para el caso del zimosán se trabajo con microgramos equivalentes de glucosa (apéndice III). Se pesaron 12.21 mg. de zimosán y se les agragó 1 ml. de amortiguador de cacodilatos de sodio, se coloco esta solución en agitación en el vortex durante 15 min. exactos a temperatura ambiente. Esta solución fue centrifugada a 2500 rpm y se recuperó el sobrenadante, el cual quedó a la concentración de 100 µg eq de gluc./ml (ver modificación al método del tetrazolio, apéndice III). Se colocó en dos alicuotas de 0.5 ml. y se guardaron a -20 °C.

APENDICE II

SOLUCIONES DE INHIBIDORES.

Los inhibidores utilizados en este trabajo fueron los siguientes: Inhibidor de Tripsina de Soya (STI), Fenilmetilsulfonil floruro (PMSF), Feniltiourea (PTU), Leupeptina (LEU), N-Etilmaleimida (N-E), N-Metilmaleimida (N-M), y Iodoacetamida (IAM); (SIGMA). Se prepararon a una concentración de 100 mM, excepto la LEU, que fué preparada a 5 mM. Se almacenaron en alícuotas de 0.5 ml. a -20 °C.

APENDICE III

MODIFICACION AL METODO DEL TETRAZOLIO (Fairbridge 1951) PARA ANALISIS DE GLUCOSA LIBRE, EN MUESTRAS DE ZIMOSAN (β -1,3 glucano).

Se preparó una solución de zimosán (5 mg/ml) en agua inyectable, en tubos de 1.5 ml. Esta solución fué agitada en el vortex durante 15 min. exactos a temperatura ambiente. La solución fué centrifugada a 4500 rpm (para eliminar la fracción no soluble) y el sobrenadante recuperó con la fracción soluble de zimosán (Zs). La muestra de Zs se hidrolizó, agregando 0.5 ml. de HCl 4N a 1 ml. de Zs y se incubó en tubos de 1.5 ml perfectamente tapado y sellado, durante 48 hrs. a 37 °C y posteriormente 15 min en baño de agua hirviendo. Después de enfriar la muestra en hielo, fue neutralizada con 0.5 ml. (o unas gotas más si se requiere) de NaOH 4N a pH 7.0 con un potenciómetro. A 300 μ l de la muestra neutralizada se le agregaron 100 μ l de MTT (dimetiltetrazolio SIGMA) al 0.5 % y 200 μ l de NaOH 1N; se

incubó 10 min. exactos a temperatura ambiente y se le agregaron 200 μ l de ác. acético 1.1N (para detener la reacción). El volumen alcanzado hasta este momento fue llevado a 2 ml. con metanol y la densidad óptica se determinó a 485 nm. Los resultados fueron interpolados en una curva obtenida previamente con glucosa.

La curva de glucosa fué preparada con las siguientes diluciones en volúmenes de 300 μ l: 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050, 1200, 1350, y 1500. A cada 300 μ l de estas diluciones se les agregaron 100 μ l de MTT y se prosigió con los pasos arriba mencionados para la muestra problema.

Los resultados de las muestras problema fueron expresados en microgramos equivalentes de glucosa por mililitro (μ g. eq. de gluc./ml.).

ESQUEMA DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA PROFENOLOXIDASA.

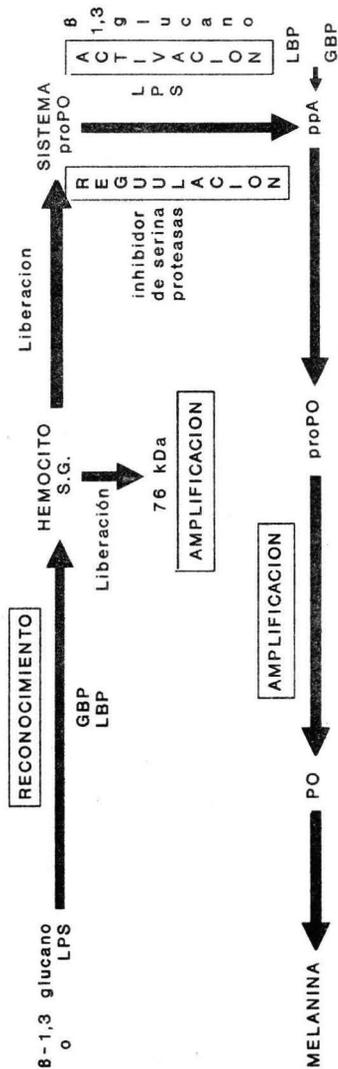


FIG. 1. Los componentes de la pared microbiana son reconocidos por las proteínas de unión a β -1,3 glucano (GBP) o LPS (LBP), que presentan receptores de reconocimiento en los hemocitos semigranulares (S.G); esto estimula la degranulación y liberación del sistema de la proPO y de la proteína de 76 kDa, la cual promueve reacciones de defensa (degranulación, adherencia celular y encapsulamiento). El sistema de la proPO, libre en el plasma, es activado por los componentes de la pared microbiana a nivel de una serina proteasa (ppa), siendo esta activación mejorada en presencia de las proteínas de unión. La proPO es convertida a fenoloxidasa (PO), paso en el cual son amplificadas otras reacciones de defensa celular (fagocitosis, formación de nódulos y quimicinesis). La enzima activa PO, cataliza la oxidación de difenoles a quinones que polimerizan no enzimáticamente a melanina. La regulación del sistema se presenta a nivel de la ppa por 2 inhibidores de serina proteasas (inhibidor de tripsina y un α_2 -macroglobulina).

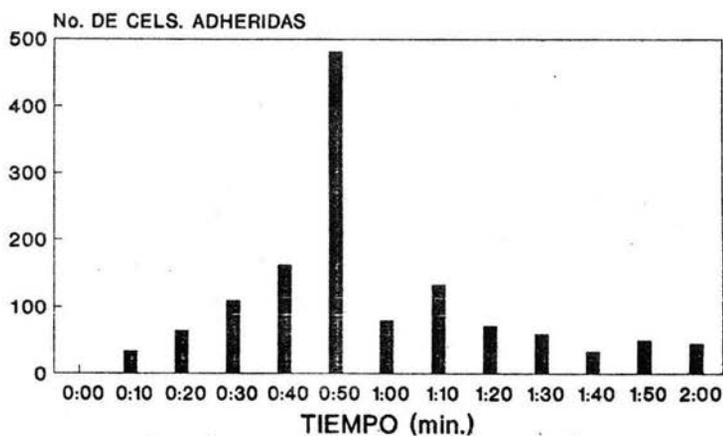


FIG. 2. CINETICA DE ADHERENCIA CELULAR AL VIDRIO. Se colocaron en un cubreobjetos aproximadamente 5×10^4 células y se incubaron a temperatura ambiente por periodos de 10 min. hasta completar 2 h. Las células adheridas se fijaron con glutaraldéhidio al 1 % y se contó el número de células adheridas a distintos tiempos. El tiempo óptimo de adherencia fue a los 50 min.

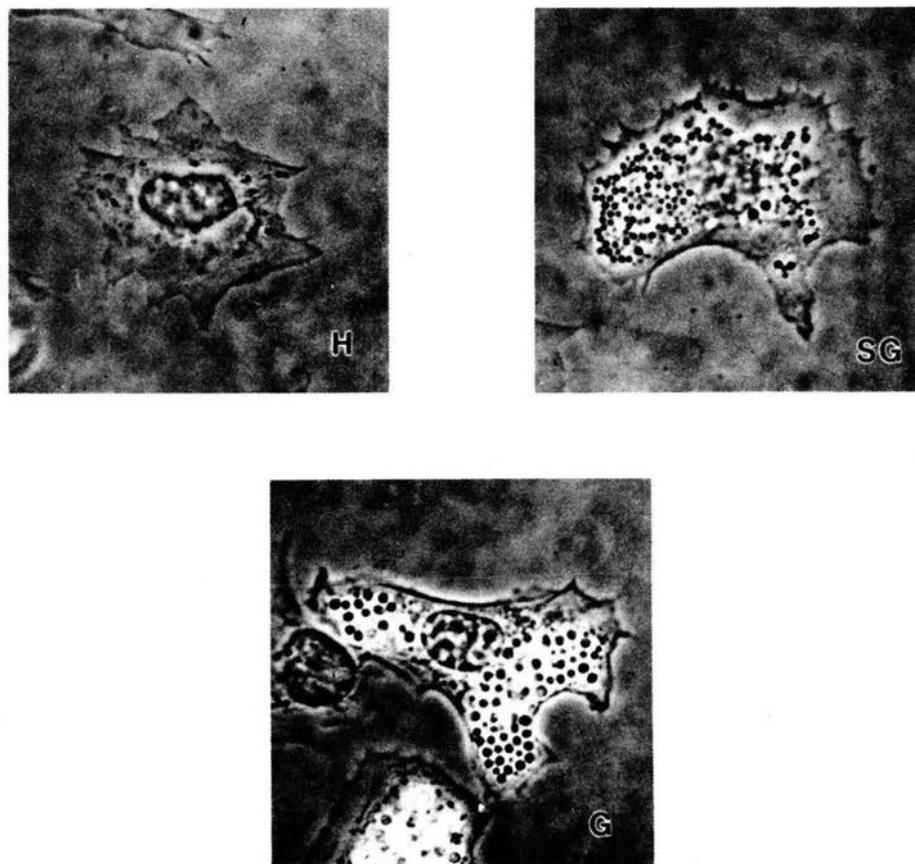


FIG. 3. TIPOS DE HEMOCITOS PRESENTES EN LA HEMOLINFA DE P. clarki. Células sanguíneas (hemocitos) adheridas a vidrio por 45 min en SSC. Se observan células hialinas (H), subgranulares (SG) y granulares (G) (Microscopía de contraste de fases 40 X).

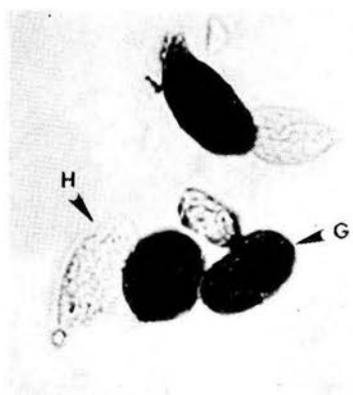


FIG. 4. REACCION CITOCUIMICA DE FENOLOXIDASA EN LOS HEMOCITOS DEL ACOCIL. Hemocitos adheridos al vidrio e incubados en presencia de L-DOPA (4 mg/ml) por 14 h. Se observa la reaccion positiva en todo el citoplasma. Las células hialinas no presentan marca de la reaccion (Microscopía óptica 40 X).

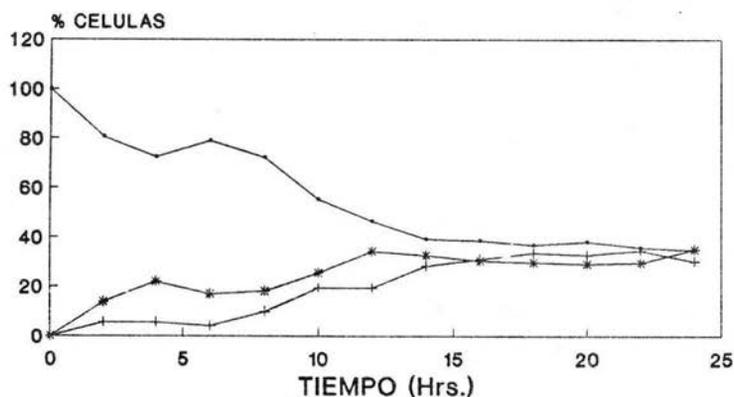


FIG. 5. CINETICA DE MARCA CON L-DOPA. Hemocitos previamente adheridos y fijados se incubaron con L-DOPA (4mg/ml) a distintos tiempos. La marca sólo se observó en las células granulares y subgranulares, obteniéndose el máximo de marca a las 14 h. Así mismo, se observa que las 3 subpoblaciones de hemocitos se encuentran en proporciones similares en la hemolinfa de *P. clarki*. (.) Céls. no marcadas, (|) Céls. subgranulares marcadas y (*) Céls. granulares marcadas.

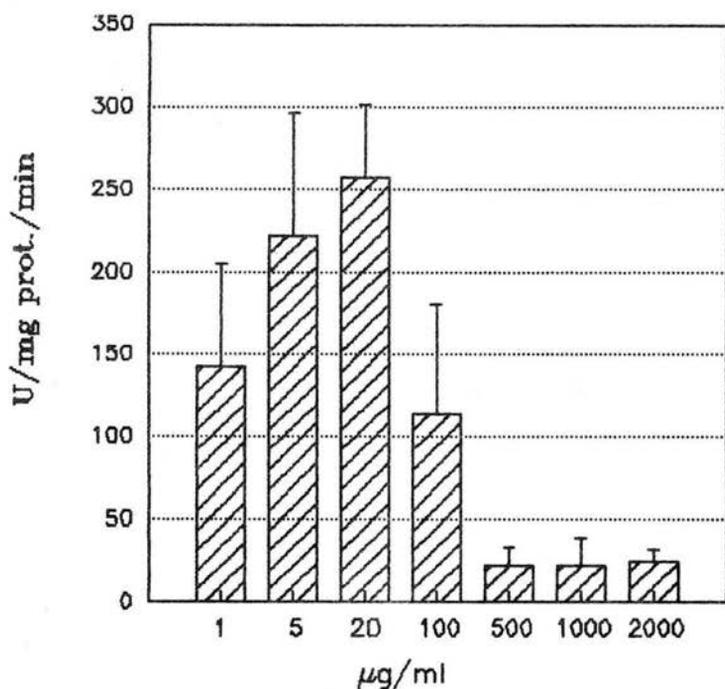


FIG. 6. CURVA DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO EN EL SLH CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LPS (*E. coli* O111:B4). La concentración a la cual se observó una mejor activación del sistema, fue de 20 µg/ml. A concentraciones elevadas (500 µg o más) se satura y se bloqueada la actividad de fenoloxidasas (PO).

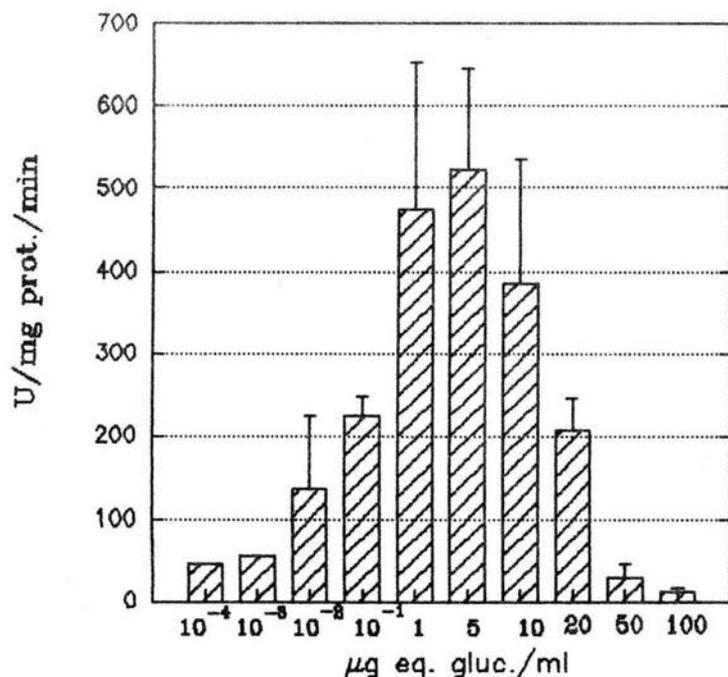


FIG. 7. CURVA DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO EN EL SLH CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ZIMOSAN (Saccharomyces cerevisiae). Se observa que la concentración a la cual activa de manera más eficiente es a 5 µg eq. de gluc/ml. Del mismo modo que sucedió con LPS, el zimosán bloquea la actividad de fenoloxidasa (PO) a elevadas concentraciones (50 µg eq. de gluc/ml).

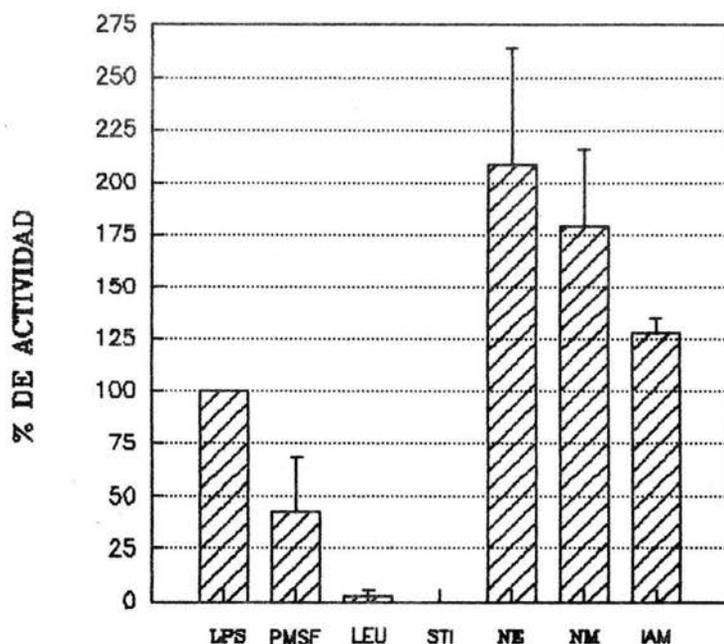


FIG. 8. EFECTO DE DISTINTOS INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO CON LPS (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se observa la inhibición de la actividad de PO, provocado por los inhibidores de serina proteasas (PMSF= Fenilmetilsulfonilfloruro, LEU= Leupeptina, STI= Inhibidor de tripsina de soya), así como el incremento de la misma actividad, promovida por los inhibidores de cistein proteasas (NE= N-etilmaleimida, NM= N-metilmaleimida y IAM= Iodoacetamida). LPS= Testigo con lipopolisacárido.

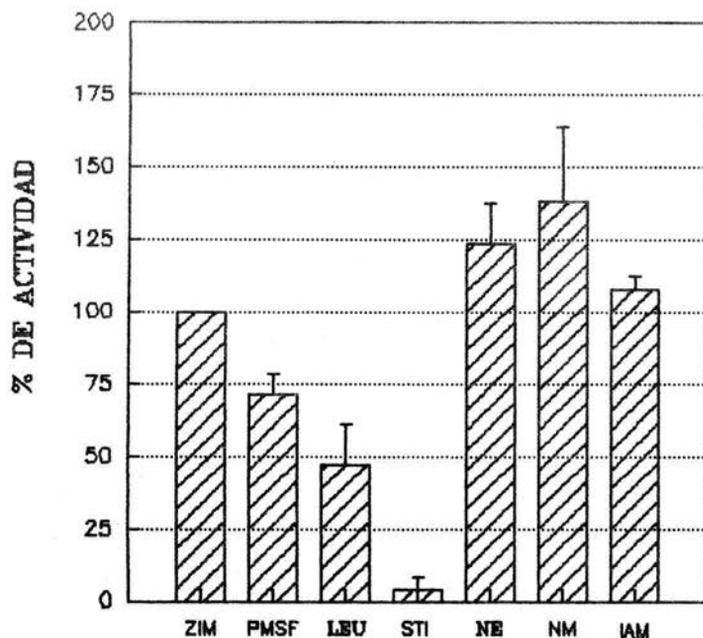


FIG. 9. EFECTO DE DISTINTOS INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO CON ZIMOSAN (5 μ g eq. de gluc/ml). El STI fue el más efectivo para inhibir la actividad de PO. ZIM= Testigo con zimosán, PMSF=Fenilmetilsulfonilfloruro, LEU= Leupeptina, STI= Inhibidor de tripsina de soya, NE= N-etilmaleimida, NM= N-metilmaleimida, IAM= Iodoacetamida.

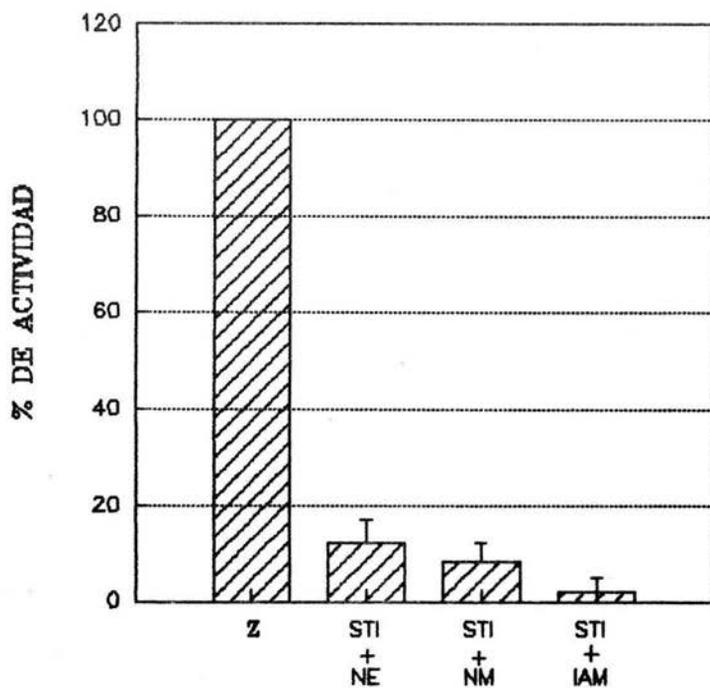


FIG. 10. EFECTO DE LA MEZCLA DE STI CON LOS INHIBIDORES DE CISTEIN PROTEASAS (N-E, N-M y IAM) SOBRE LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO CON ZIMOSAN (5 μ g eq. de gluc/ml). Cuando el sistema es tratado previamente con el inhibidor de serina proteasas (STI), la hiperactivación observada con los inhibidores de cistein proteasas no aparece.

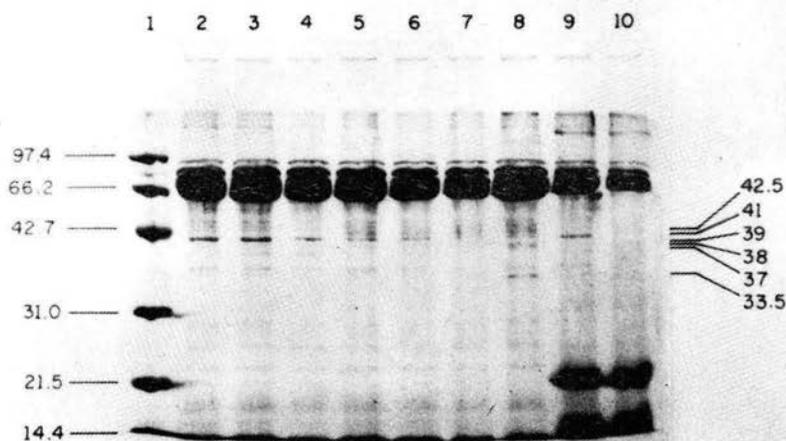


FIG. 11. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 15 %. CINETICA DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO CON ZIMOSAN (5 μg eq. de gluc/ml). Las muestra de SLH (2 mg/ml de proteína) fueron incubadas en presencia de zimosán a 37 °C y la reacción fue detenida a diferentes tiempos. En cada carril se colocaron 20 μg de proteína y se migraron electroforéticamente como se describe en material y métodos. Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, SLH incubado en presencia de DMF (dimetilformamida) durante 30 min; carril 3, SLH incubado durante 30 min; carril 4 al 8, diferentes tiempos de incubación del SLH con zimosán (0,10,20,30, y 60 min respectivamente); carril 9, SLH incubado con zimosán y STI durante 30 min; carril 10, lisado incubado 30 min. con zimosán y después 30 min adicionales con STI.

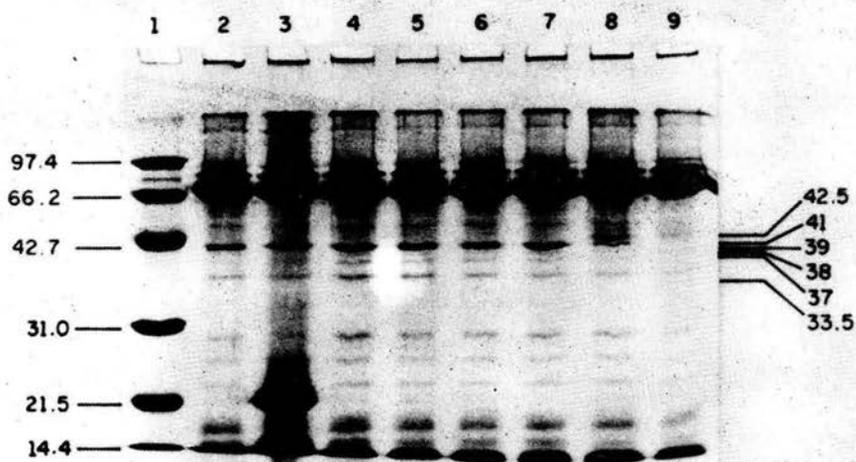


FIG. 12. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 15 %. CINETICA DE ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO CON LPS (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras de SLH (2 mg/ml de proteina) fueron incubadas en presencia de LPS a 37 °C y la reacción fue detenida a diferentes tiempos. En cada carril se colocaron 20 μg de proteina y se migraron electroforéticamente como se describe en material y métodos. Carril 1, marcadores de peso molecular; carril 2, SLH incubado durante 120 min, carril 3, SLH incubado con LPS y STI; carril 4 a 9, diferentes tiempos de incubación con LPS (0,10,20,30,60 y 120 min respectivamente).

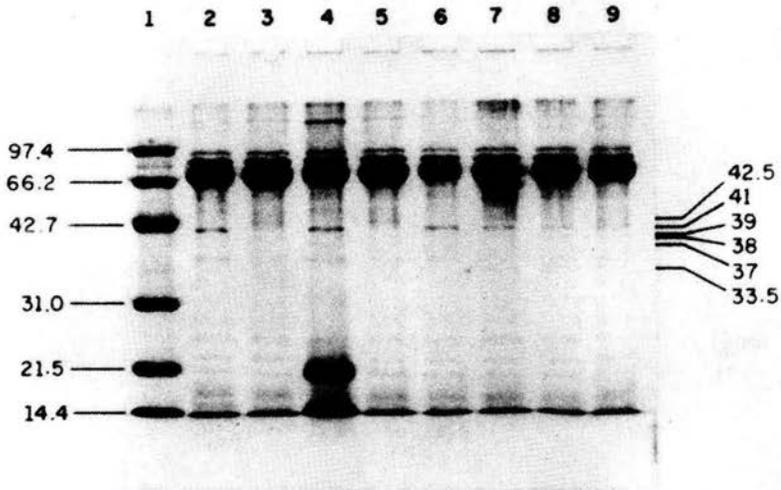


FIG. 13. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 15 %. EFECTO DE DIFERENTES INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO EN EL SLH. Las muestras de SLH (2 mg/ml) fueron incubadas con zimosán (5 μ g eq. de gluc/ml) e inhibidores de proteasas (10 mM en la mezcla de reacción, excepto la LEU que quedo a 0.5 mM) a 37 °C durante 30 min. En cada carril se colocaron 20 μ g de proteína y se migraron electroforéticamente como se describe en material y métodos. Carril 1; marcadores de peso molecular; carril 2, SLH sólo; carril 3, SLH con zimosán; carril 4 a 9, SLH con zimosán más el inhibidor (STI, LEU, PMSF, N-E, N-M, y IAM respectivamente).

T A B L A I

CHO (mg/ml)	SLH (mg prot./ml)	UNIDADES/mg prot./min
Zimosán 0.005	1.702	98.70
Zimosán 0.500	3.000	570.66
Zimosán 1.000	3.208	421.44
LPS 0.160	3.000	120.66
LPS 1.000	3.208	91.64
LPS 2.000	3.208	347.88
Laminarina 0.005	1.702	83.43
Laminarina 0.100	1.702	103.40
Laminarina 1.440	1.365	169.96
Otros CHOs 0.1-33	2.209	118.96
Testigo (Amortiguador I)	2.000	97.00

CARBOHIDRATOS UTILIZADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ACTIVACION DEL SISTEMA DE LA proPO. Se muestran los carbohidratos utilizados (CHO) y la concentración a la cual activaron el sistema. Evidentemente el zimosán y el LPS son los que activan mejor el sistema, y no así la laminarina. Los otros CHOs (heparina, galactosamina y glucosamina) mostraron un bajo reconocimiento por parte del sistema. El testigo (con Amortiguador I) mostro niveles de activación basal de 97 U/mg de prot./min.

T A B L A I I

LPS ($\mu\text{g/ml}$)	D.O (490 nm)	ZIMOSAN ($\mu\text{g eq. de gluc/ml}$)	D.O (490 nm)
1	0.361	0.01	0.402
5	0.513	0.10	0.504
20	0.531	1.00	1.368
100	0.375	5.00	1.325
500	0.022	10.00	1.035
1000	0.025	20.00	0.358
2000	0.014	50.00	0.038

ABSORBANCIAS (D.O) ENCONTRADAS DURANTE ENSAYOS DE FENOLOXIDASA. En la tabla se muestran algunas de las lecturas encontradas durante los ensayos de fenoloxidasa. El SLH fue incubado en presencia de LPS o el sobrenadante de zimósán (Zs) durante 30 min. a 37 °C. Posteriormente se incubó con L-DOPA (4 mg/ml) durante 20 min a temperatura ambiente y la densidad óptica fue leída a 490 nm. El testigo (con Amortiguador I) mostro niveles de activación basales de D.O= 0.036.