



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*  
Universidad Nacional Autónoma de México



CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA  
LECTINA DEL CAMARÓN BLANCO DEL GOLFO  
DE MÉXICO *Litopenaeus setiferus*.

**T E S I S**

que para obtener el grado académico de

**Doctor en Ciencias**  
(Biología Marina)

p r e s e n t a:

ING. JUAN JOSÉ ALPUCHE OSORNO.

Director de Tesis:  
DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ

Comité Tutorial:  
DR. EDGAR ZENTENO GALINDO  
DRA. M. GABRIELA GAXIOLA CORTÉS.  
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA.  
DR. ANTONIO PEÑA DÍAZ.  
DR. FRANCISCO VARGAS ALBORES.  
PhD. GERARDO R. VASTA.

Ciudad Universitaria, México, D.F. Junio del 2007



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.

El presente trabajo fue realizado en parte en el laboratorio 6 de Inmunología del departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de los Dres. Carlos Rosas Vázquez, Concepción Agundis Mata y Ali Pereyra Morales, con financiamiento del programa UNAM-PAPIIT (224806) y en la Unidad de Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán, con financiamiento del programa UCMEXUS-CONACYT, SEP- CONACYT (2002-C01-40987).

Agradezco el apoyo de las becas CONACYT (171021) y DGEP-Universidad Nacional Autónoma de México (503004916); sin las cuales habría sido imposible la realización de esta tesis.

## **Agradecimientos**

**A la señora Socorro Osorno Delgado.**

*Gracias Madre, creo que nunca te lo he dicho, pero Te Amo, todo esto te lo debo a ti.*

**A Carlos y Miguel**

*Gracias hermanos por su apoyo y por creer en mi siempre.*

**Al Sr. Miguel Alpuche Trejo.**

*Gracias padre, por tus bendiciones, ojalá algún día pueda ser la mitad del gran ser humano que  
eras tu.*

*Aprendí tanto y tan poco de ti...*

*Que dios te bendiga.*

***Al mar y los sueños.***

*P*arece que fue ayer... Aquellas tardes radiantes de sueños, esperanzas y paz.  
Extraño aquellas tardes, sentarme en el malecón a mirar el atardecer, sin prisa; extraño la brisa del mar, las gaviotas, la puesta de sol y cada una de las olas, en definitiva extraño al mar.  
En esos amaneceres todo era fácil, la vida era mágica, los sueños eran... sueños y nada más.

*Gracias a quienes me alentaron a seguir mis sueños, A Agustín Castro, a cada uno de mis profes del ITMAR, a cada uno de mis amigos, Wendy, Freddy, Yescas, Abad, Villasís, Ofmara, y Vianey... GRACIAS por creer en mí.*

*P*arece que fue ayer... Aquellas mañanas frías, llenas de esperanza, deseo, de lucha.  
Extraño aquellas mañanas, extraño sentarme en el metro a ver la gente pasar, extraño las clases, la comida, las fiestas, ¡el gato macho!, pero en definitiva extraño al mar.  
En esos amaneceres todo parecía nuevo, la vida era extraña, mágica, los sueños... eran lucha.

*Gracias a quienes compartieron sus sueños con el mío, a los doctores de Ciencias del Mar, a Lupita, Gaby, Norma, Diana, y Chantal; a mis amigos, Omar, Alejandro, Andrea, Pilar, Carlos, y Yadira... GRACIAS por estar conmigo.*

*P*arece que fue ayer... Aquellos días largos llenos de ¡lectinas!, de entender lo incomprendible, de lucha y de mucho entusiasmo.  
Extraño esos días, extraño la comida, los tacos en el metro, los fines fuera de la ciudad, los viajes, los congresos, pero en definitiva extraño al mar.  
En esos días todo parecía complicado, mágico, los sueños parecían alcanzables.

*Gracias a quienes me alentaron y ayudaron a soñar despierto, a mamá Conch y el Doc. Z, todos en el lab de inmuno del depto de Bioquímica, de la Fac. de Medicina, a cada uno de mis amigos, Gis, Martínez, Sandy, Carlos, Poncho, Ali, e Hilén... MIL GRACIAS por ayudarme tanto.*

*H*oy sigo extrañando aquellas tardes en mi pueblo, los atardeceres, las mañanas frías en el metro, los días en el laboratorio trabajando. Sin embargo, Hoy aquellos sueños se han renovado y son parte de una realidad, aunque las esperanzas, la lucha, y el entusiasmo siguen conmigo todos los días.

*Gracias a todas las personas que creyeron en mí y que me alentaron a seguir adelante, Al Dr. Carlos Rosas, Dra. Gaby Gax, Mayte Mascaró, Adolfo Sánchez, Gabriel Taboada, Cristina Pascual, Pedro Gallardo, Ariadna, Adriana, Gaby, Jaime, en fin.. a todo mis amigos del grupo de Biología Marina Experimental, Gracias por la oportunidad.*

*A Marus y toda la familia, gracias por el cariño.  
A la jefa et al., gracias por estar siempre ahí, en las buenas, las malas y las peores.  
Al Dr. Gerardo Vasta, a mis tutores y la Dra. Vilaclara, Gracias por sus enseñanzas.*

*A todos los camarones que involuntariamente sacrificaron su vida.*

*Juan José Alpuche Osorno*

*Verano, 2007.*

## Contenido

PREFACIO	I
ABREVIATURAS USADAS	IV
LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	10
EL CAMARÓN BLANCO DEL GOLFO, LITOPENAEUS SETIFERUS.	10
CAMARONICULTURA	11
GENERALIDADES DE LA RESPUESTA INMUNE	11
FISIOLOGÍA Y RESPUESTA INMUNE EN CAMARONES PENEIDOS	13
SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROFENOLOXIDASA (PROFO)	15
ENCAPSULACIÓN	16
PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	16
FAGOCITOSIS	17
LECTINAS	17
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
METAS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
ORGANISMOS	26
PREPARACIÓN DEL SUERO	26
PURIFICACIÓN DE LA LECTINA.	27
DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y CARBOHIDRATOS.	27
DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA LECTINA	27
PESO MOLECULAR NATIVO	28
COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS	28
COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS.	29
ANÁLISIS PROTEÓMICO	29
DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA NH <sub>2</sub> -TERMINAL.	30
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE	30
ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS.	31
DEPENDENCIA POR CATIONES DIVALENTES	31
DETERMINACIÓN DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO	32
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	32
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	33
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS DE LA LECTINA.	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RESULTADOS	35
ORGANISMOS	35
PURIFICACIÓN DE LECTINA.	35
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA.	36
COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS.	38
ANÁLISIS PROTEÓMICO POR MALDI-TOF	39

SECUENCIACIÓN DE LA PORCIÓN -NH <sub>2</sub> .	40
SECUENCIAS INTERNAS DE LSL.	40
ESTRUCTURA SECUNDARIA POR DICROÍSMO CIRCULAR.	40
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.	41
ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS.	41
EFECTO DE CATIONES DIVALENTES EN LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE LSL.	43
ESTALLIDO RESPIRATORIO	43
EFECTO DE AZÚCARES Y GLICOPROTEÍNAS EN EL ESTALLIDO RESPIRATORIO.	44
IDENTIFICACIÓN DE HEMOCITOS DE CAMARÓN POR LSL.	45
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	45
RECEPTOR CELULAR PARA LA LECTINA LSL	46
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	47
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS	71



## Lista de figuras

FIGURA 1.- CAMARÓN BLANCO DEL GOLFO DE MÉXICO, <i>LITOPENAEUS SETIFERUS</i> .....	10
FIGURA 2.- POBLACIONES CELULARES IDENTIFICADAS EN CRUSTÁCEOS, H:- HIALINOCITOS, SG:-SEMIGRANULOCITOS, G:-GRANULOCITOS.....	14
FIGURA 3.- SISTEMA DE ACTIVACIÓN DE LA PROFENOLOXIDASA EN CRUSTÁCEOS.....	16
FIGURA 4.- MECANISMOS DE INMUNIDAD MEDIDAS POR LECTINAS A ESTUDIAR EN <i>L. SETIFERUS</i> .....	19
FIGURA 5. PERFIL DE ELUSIÓN DE LSL DE SUERO DE ORGANISMOS ADULTOS POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD UTILIZANDO UNA COLUMNA (0.6 X 10 CM) CON ESTROMA DE ERITROCTOS DE CONEJO .. LA LECTINA FUE ELUIDA ADICIONANDO ÁCIDO ACÉTICO AL 3% EN AGUA. A CADA FRACCIÓN DE 1 ML SE LE DETERMINÓ ABSORBANCIA A 280 NM (—) Y ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE, REPORTADA COMO EL NÚMERO DE UNIDADES HEMAGLUTINANTES (UHA), EN PRESENCIA DE ERITROCITOS DE CONEJO AL 2% (▲), A LAS FRACCIONES ELUIDAS CON ÁCIDO ACÉTICO SE LES AJUSTÓ EL PH A 6 CON NAOH 1M PREVIO AL ENSAYO DE AGLUTINACIÓN. ....	36
FIGURA 6.- DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LA LECTINA LSL EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES POR CROMATOGRFÍA POR FILTRACIÓN EN GEL. LOS MARCADORES DE PESO MOLECULAR FUERON: 1. TIROGLOBULINA BOVINA (670 kDA); 2. GAMMA-GLOBULINA BOVINA (158 kDA) 3. OVALBÚMINA (44 kDA); 4. MIOGLOBINA (17 kDA); 5. VITAMINA B-12 (1.35 kDA). ....	37
FIGURA 7. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE LA LECTINA LSL EN SDS-PAGE AL 10% DE A ) 10 µG DE LSL PURIFICADA POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD, B ) 50 µG HEMOLINFA DE <i>L. SETIFERUS</i> . MARCADORES DE PESO MOLECULAR: MIOSINA (200 kDA), β-GALACTOSIDASA DE <i>E.</i> <i>COLI</i> (116 kDA), ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (66 kDA), OVALBÚMINA (45 kDA), ANHIDRASA CARBÓNICA DE BOVINO (29 kDA), INHIBIDOR DE TRIPSINA (21.5 kDA) Y APOPROTEINA (6.5 kDA.).....	38



FIGURA 8.- ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA LECTINA LSL POR DICROISMO CIRCULAR.....	41
FIGURA 9.-EFECTO DE CATIONES EN LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE LSL. $CaCl_2$ (▲), $MgCl_2$ (Δ) O $MnCl_2$ (■). LA CONCENTRACIÓN INICIAL DE PROTEÍNA FUE DE 0.1 MG/ML; SE UTILIZARON Y SE PROBARON CON ERITROCITOS DE CONEJO 2% EN PBS.....	43
FIGURA 10. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE HEMOCITOS DE <i>L. SETIFERUS</i> MARCADOS CON LSL-BIOTINA Y REVELADOS CON AVIDITAFITC. A) HEMOCITOS SUSPENDIDOS (LAS FLECHAS INDICAN EL MARCAJE PRINCIPALMENTE EN GRÁNULOS) 100X, B.) HEMOCITOS ADHERIDOS (LAS FLECHAS INDICAN EL MARCAJE PRINCIPALMENTE EN PSEUDÓPODOS) 60 X. G. HEMOCITOS GRANULARES, H. HEMOCITOS HIALINOS, 60X.....	45
FIGURA 11.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LSL REVELADA CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-LSL.....	46
FIGURA 12.- IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR EN HEMOCITOS DE <i>L. SETIFERUS</i> POR ELECTROTRANSFERENCIA. CARRIL A) 50 $\mu$ G/ML DE HEMOCITOS LISADOS, CARRIL B) LISADO DE HEMOCITOS REVELADO CON LECTINA LSL-PEROXIDASA.....	47
FIGURA 13.- MECANISMOS DE DEFENSA CONOCIDOS EN CRUSTÁCEOS.....	58

## Lista de tablas

TABLA 1.- CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LAS LECTINAS DE CAMARONES PENEIDOS REPORTADAS. ....	21
TABLA 2. PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA LECTINA LSL POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	36
TABLA 3.- COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS DE LSL.....	38
TABLA 4. PÉPTIDOS DE LA LECTINA DE LITOPENAEUS SETIFERUS IDENTIFICADOS POR MALDI-TOF. ....	39
TABLA 5. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS MÚLTIPLES (CLUSTAL W) N- TERMINALES DE LSL, DE CUATRO MUESTRAS DIFERENTES. ....	40
TABLA 6. SECUENCIAS DE PÉPTIDOS INTERNOS DE LA SUBUNIDAD DE 85 KDA DE LSL.....	40
TABLA 7. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA LSL.....	42
TABLA 8.- ESPECIFICIDAD DE LSL POR CARBOHIDRATOS Y GLICOPROTEÍNAS. ....	42
TABLA 9.- EFECTO DE LA LECTINA EN LA PRODUCCIÓN DE NBTR POR HEMOCITOS DE <i>L. SETIFERUS</i> . ....	44
TABLA 10.- EFECTO DE CARBOHIDRATOS EN EL ESTALLIDO RESPIRATORIO.....	44

## Resumen

Del suero del camarón blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus* se purificó una lectina (LsL) de 291 kDa por cromatografía de afinidad utilizando una columna con estroma de eritrocitos de conejo. LsL es un heterotetrámero constituido por 2 subunidades de 80 kDa y 2 de 52 kDa, está compuesta principalmente por aspartato, glutamato, glicina y alanina, con un bajo contenido de metionina y cisteína y no contiene carbohidratos en su composición. La secuencia N-terminal esta compuesta por DAQ(N/H)(A/L)HQKQHVDVNFLLHKIYGDIQN y la huella peptídica analizada a partir de péptidos trípticos por MALDI-ToF, permite identificar que LsL no posee homología con alguna lectina reportada, sin embargo las subunidades de 80 y 52 kDa presentan similitud de 23 y 22 %, respectivamente, con el precursor de hemocianina de *L. vannamei*. El análisis por dicroísmo circular permitió identificar que LsL posee en su estructura secundaria 52.7% de hojas beta plegadas y 6.1% de alfa hélices. LsL aglutina eritrocitos de conejo, cuyo y rata, esta actividad es dependiente de la presencia de cationes divalentes, principalmente calcio. Los azúcares N-acetilados como GlcNAc, GalNAc y NeuAc, así como proteínas O-glicosiladas como las mucina submaxilar y la fetuina bovina, y la IgA humana inhiben específicamente de la hemaglutinación. La desialilacion de eritrocitos elimina la actividad aglutinante y de las glicoproteínas inhibitorias, elimina el efecto inhibidor de la actividad hemaglutinante. LsL posee homo-receptores en los hemocitos circulantes, reconoce principalmente (85%) a los hemocitos que contienen gránulos, filipodios o pseudópodos, e induce la producción de radicales libres de oxígeno (ROIs), la dosis óptima es 2 µg/ml de lectina por  $1 \times 10^5$  hemocitos y con 20 minutos de activación. La producción de ROIs por células activadas con LsL también se inhibe con NeuAc, GalNAc o GlcNAc. El receptor de LsL en membrana de hemocitos es un hetero-dimero de 161 y 152 kDa, identificado por electrotransferencia de lisado de hemocitos y revelado con la lectina marcada con peroxidasa, lo que sugiere que LsL activa la producción de ROIs a través de un receptor específico de membrana.

## Abstract

A lectin of 291 kDa was purified from the serum of the white shrimp of the Gulf of México *Litopenaeus setiferus* by affinity chromatography using a column containing stroma of rabbit erythrocytes. LsL is a tetramer with two 80 kDa and two 52 kDa subunits, mainly composed by aspartate, glutamate, glycine and alanine, and a low content of methionine and cysteine, and it lacks carbohydrates in its composition. The N-terminal sequence is composed by DAQ(N/H)(A/L)HQKQHDVNFLHKKIYGDIQN, also, the peptide fingerprint of tryptic peptides of each lectin subunit was analyzed by MALDI-ToF; indicating that both subunits showed similarity of 23 and 22 %, for 80 and 52 kDa subunits respectively, with the precursor of hemocyanin in *L. vannamei*. The analysis by circular dichroism, indicates that the protein contains in its secondary structure 52,7% of beta sheets and 6,1% of alpha helix. LsL agglutinates erythrocytes of rabbit, guinea pig and rat, this activity is dependent of divalent cations, mainly calcium. N-acetylated carbohydrates such as GlcNAc, GalNAc and NeuAc, as well as the O-glycosylated proteins, MSB, IgA and Fetuin were specific inhibitors of the hemagglutination. Desialylation of erythrocytes eliminates the capacity of LsL to agglutinate, and asialoforms of glycoproteins showed no inhibitory capacity of the lectin. LsL recognized 85% of the hemocytes that contain granules, filipodia or pseudopodia, and induced the production of oxygen free radicals (ROIs), optimal activation dose was at 2 µg/ml LsL for  $1 \times 10^5$  hemocytes and 20 min of activation. The production of ROIs was inhibited with NeuAc, GalNAc or GlcNAc. The receptor for LsL in membrane of hemocytes is a dimeric protein of 161 and 152 kDa as determined in western blot analysis revealed with peroxidase-labeled LsL. Our results suggest that seric lectin activates the production of ROIs through a specific membrane receptor.

## Introducción

### ***El camarón Blanco del Golfo, Litopenaeus setiferus.***

El camarón blanco es una de las especies mejor estudiadas, por la importancia económica de las capturas comerciales y como una especie de gran potencial para el desarrollo de su cultivo el Golfo de México. El hábitat de *L. setiferus* se extiende desde Nueva York en Estados Unidos de Norte América, y a través de todo el Golfo de México, hasta el estado de Campeche en la República Mexicana (Muncy, 1984).



**Figura 1.- Camarón blanco del Golfo de México, *Litopenaeus setiferus*.**

Los organismos juveniles de *Litopenaeus setiferus* (Figura 1), copulan y desovan en aguas oceánicas costeras de marzo a septiembre con picos máximos en mayo y agosto a profundidades entre 18 y 27 m. El hábitat de la especie puede dividirse de acuerdo con su desarrollo y crecimiento en tres etapas: La primera corresponde al desarrollo embrionario, larvas y estadio juvenil temprano, en esta

etapa el hábitat corresponde a aguas oceánicas, la vida de los camarones es planctónica y su distribución horizontal está controlada principalmente por las corrientes marinas. La segunda etapa corresponde a los estadios juvenil tardío y preadultos, tiene un hábitat que se encuentra en las áreas de maternidad y crecimiento, que corresponde a bahías cerradas, lagunas costeras, y sistemas estuarinos, los camarones juveniles adquieren hábitos bentónicos y finalmente la tercera etapa que involucra a los adultos inmaduros y maduros, con el mar abierto como hábitat (Bray *et al.*, 1982; Browdy *et al.*, 1996; King, 1948).

### ***Camaronicultura***

El cultivo de camarones peneidos, genera ganancias del orden de billones de dólares en países como Ecuador, Brasil, China, y Tailandia (Harvey *et al.*, 2004). *Litopenaeus monodon*, es la especie más cultivada en el continente Asiático, en tanto que en América Latina, incluyendo México, *L. vannamei* es la especie que se encuentra en las granjas de cultivo (Brock and Main, 1994; Cuzon *et al.*, 2004; Lotz & Ogle, 1994; López *et al.*, 2003; Misamore and Browdy, 1996; Ogle, 1992; Palacios *et al.*, 1999). Sin embargo, en el desarrollo de la acuicultura en márgenes del Golfo de México, el camarón blanco *L. setiferus* se encuentra en etapa de experimentación, por ser una especie endémica de la región ya que puede ser cultivada, en las condiciones e infraestructura con las que ya se cuenta.

### ***Generalidades de la respuesta inmune***

Inmunidad es un conjunto de mecanismos defensa que permiten a un organismo protegerse de los agresores que se encuentran en su medio ambiente, permiten controlar el desarrollo de células y eliminar moléculas nocivas originadas en su interior como consecuencia de envejecimiento, infecciones, traumas o

desarrollo neoplásico (Roitt *et al.*, 2001). En los vertebrados, la primera línea de defensa la constituyen las células epiteliales; los patógenos que atraviesan esta barrera, se encuentran con diversos componentes de la respuesta inmune innata, que corresponden a la respuesta humoral del huésped bien sea por la activación de la vía alterna del complemento o activando procesos opsónicos que facilitan la fagocitosis o una respuesta celular en la cual células con actividad fagocítica reconocen a un elemento no-propio eliminándolo. La regulación de la respuesta inmune es el resultado de la interacción de factores humorales como las interleucinas con sus receptores, por ejemplo IL-1 e IL-6, que inducen en grupos celulares la síntesis de proteínas de fase aguda, como proteína C reactiva o la proteína de unión a manosa, que tienen la capacidad de opsonizar bacterias y activar la cascada del complemento. La siguiente fase está dada por los linfocitos T y B, que forman parte de la respuesta inmune adaptativa, que se caracteriza por ser específica y tener memoria (Roitt *et al.*, 2001).

En la actualidad, se conoce que los mecanismos de defensa de invertebrados, representan a los que podrían ser precursores de algunos de los eventos de la inmunidad en vertebrados, donde se requiere de una compleja participación de grupos celulares especializados y factores humorales específicos que son generados contra un determinado antígeno (Renwranz, 1986). El estudio de la respuesta inmune de los invertebrados se ha realizado principalmente en la hemolinfa, en donde se ha demostrado que algunos factores poseen especificidad de reconocimiento semejante a la demostrada por los anticuerpos (Vázquez *et al.*, 1998; Bachere, 2000). En diversos estudios sobre la respuesta inmune en

crustáceos se ha sugerido, que al igual que la de vertebrados, que está dada por una cooperación de procesos celulares y humorales (Ratcliffe, 1989).

Los decápodos poseen un sistema circulatorio abierto, mediante el cual son distribuidos nutrientes, hemocianina, hormonas, moléculas inmunoreactivas, células fagocíticas y enzimas que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune de la especie (como las Peroxinectinas, péptidos antimicrobianos, Lisozimas, proFO, SOD, etc). Los mecanismos de defensa en crustáceos es llevada a cabo principalmente por los hemocitos que son transportados por la hemolinfa hasta el sitio en donde son requeridos, activando mecanismos de defensa que incluyen fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos, coagulación, aglutinación y actividad antibiótica (Sritunyalucksana and Söderhall, 2000).

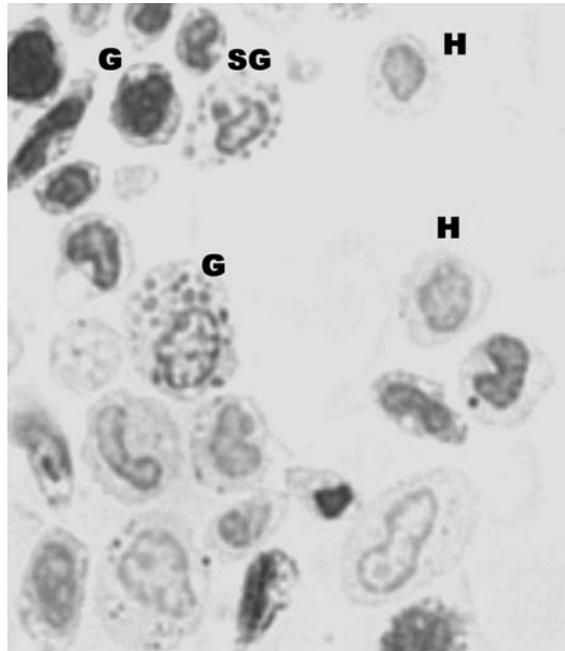
En invertebrados, las barreras físicas son el primer obstáculo para detener a los microorganismos patógenos. Cuando hay daño tisular, los microorganismos logran invadir los tejidos, desencadenando rápidamente cascadas proteolíticas (Ratcliffe, 1989) que permiten eliminar o disminuir la cantidad de microbios que invadan al organismo. La cascada de la coagulación, evita la pérdida de hemolinfa del crustáceo y activa procesos de oxidación-reducción como la producción de melanina a través del sistema de activación de la profenoloxidasas (proFO) (Kawabata, 1996; Le Moullac *et al.*, 1998; Sritunyalucksana and Söderhall, 2000; Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000), la que a su vez, activa la fagocitosis y la encapsulación (Johansson and Söderhäll, 1989).

### ***Fisiología y Respuesta inmune en camarones peneidos***

En los mecanismos de defensa de crustáceos, se han estudiado factores que actúan como reguladores o efectores de la inmunidad en organismos sometidos a estrés por captura, condiciones ambientales, y efectos de inmunoestimulantes (Pascual *et al.*, 2006). La respuesta fisiológica se ha evaluado por el conteo de hemogramas, la determinación de los reactivos intermediarios de oxígeno (ROI's), proFO, FO y la determinación de la concentración de proteína en plasma (López *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2006). En los individuos sometidos a estrés hay una correlación entre una alta mortalidad y el abatimiento de los mecanismos de defensa, por lo que el individuo se torna incapaz para defenderse aún de bacterias de la flora normal. Las temperaturas extremas también reducen la capacidad de regular el mecanismo de activación de la proFO, la fagocitosis, la coagulación y la encapsulación, debido a una baja en la concentración de hemocitos en circulación, lo que resulta en alta mortalidad de la población residente. (Lopez *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2002).

En crustáceos existen en general, tres poblaciones de hemocitos circulantes clasificados de acuerdo a su morfología y granularidad. Los hialinocitos, presentan pocos gránulos, participan en la formación del coágulo y en la fagocitosis. Los semigranulocitos presentan gránulos intraplasmáticos, que liberan factores bactericidas y reguladores que participan en la opsonización del invasor. Las células granulocíticas son las células más complejas del sistema de defensa en crustáceos, presentan múltiples gránulos intraplasmáticos, liberan una gran cantidad de factores mediadores, reguladores y de ataque (Figura 3). El principal mecanismo de defensa en los crustáceos; el sistema proFO, es liberado

por estas células, así como péptidos antibacterianos y antifúngicos (Destoumieux *et al.*, 2000).



**Figura 2.- Poblaciones celulares identificadas en crustáceos. (H:-Hialinocitos, SG:- Semigranulocitos, G:-Granulocitos).**

### ***Sistema de activación de la profenoloxidasa (proFO)***

Este sistema es una cascada enzimática que en crustáceos, puede ser activada por lipopolisacáridos (LPS) o por  $\beta$ -glucanos, (carbohidratos de la pared celular de bacterias Gram-negativas y hongos), provocando la desgranulación de los hemocitos (Söderhall and Smith, 1986; Vargas-Albores *et al.*, 1996). En los hemocitos el precursor enzimático de esta vía se encuentra inactivo, al liberarse al hemocele, es activado catalizando la o-hidroxilación de monofenoles y la oxidación de fenoles a quinonas. En este proceso la fenoloxidasa (FO) convierte tirosina a 3,4 dihidroxi-fenilalanina (DOPA) así como DOPA a DOPA-quinona, seguida de varios intermediarios para finalizar en la síntesis de melanina, pigmento pardonegrozco que tiene la propiedad entre otras de inhibir la actividad de enzimas

bacterianas y fúngicas (Smith and Söderhäll, 1983) (Figura 2). Durante el proceso de activación del sistema, se liberan factores de adhesión (FA) que recubren de manera inespecífica a los microorganismos invasores favoreciendo su adhesión y provocando la amplificación del sistema mediante la desgranulación de más hemocitos. Así mismo, se ha observado que la FO estimula la fagocitosis, la formación de nódulos y la encapsulación de agentes extraños (Johansson and Söderhäll, 1989).

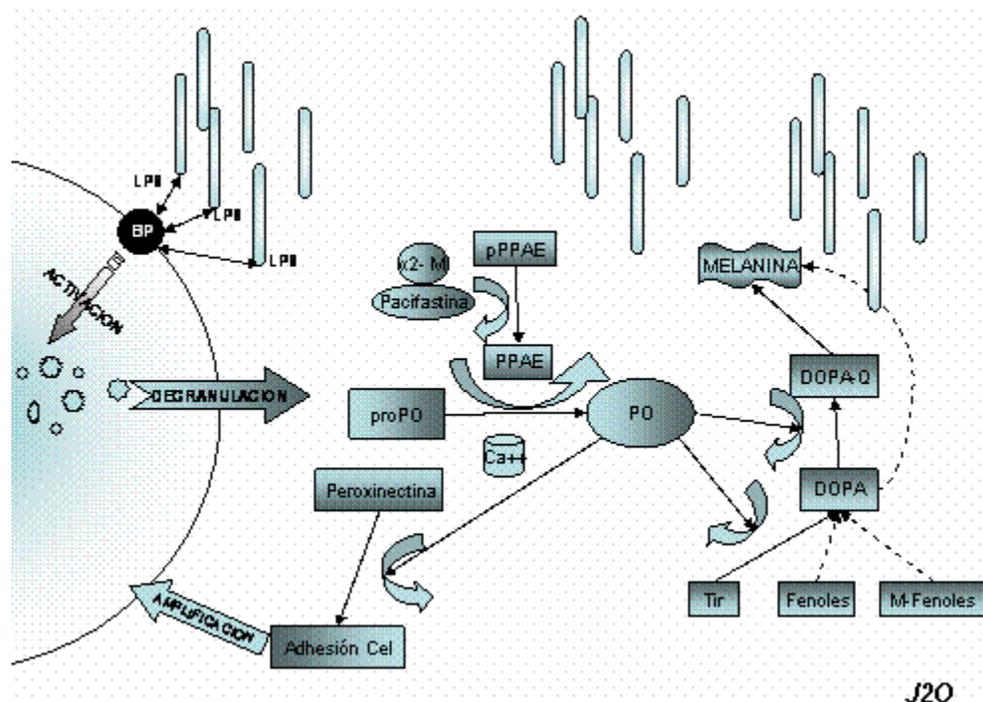


Figura 3.- Sistema de activación de la profenoloxidasasa en crustáceos.

### Encapsulación

La encapsulación es una respuesta multicelular que permite la eliminación de partículas extrañas que no pueden ser fagocitadas ni destruidas por otros mecanismos. Este proceso restringe el movimiento y crecimiento de patógenos en la cavidad del hemocele, provocando su muerte por la disminución de la

concentración de oxígeno, la participación de hidrolasas y/o la acción tóxica de las quinonas (Durliat, 1985; Persson and Söderhäll, 1987).

### ***Péptidos antimicrobianos***

Los péptidos antimicrobianos son moléculas ubicuas de bajo peso molecular que actúan como antibióticos endógenos y son considerados claves en la inmunidad innata. Se han descrito dos familias en camarones peneidos: Las penaedinas, que son expresadas aparentemente en forma constitutiva, están almacenadas en gránulos plasmáticos, y se liberan por exocitosis ante un estímulo microbiano. Presentan actividades tanto antibacterianas como antifúngicas (Destoumieux, 2000).

Las crustinas, descritas inicialmente en *Carcinus maenas*, como proteínas de 11.5 kDa con actividad contra bacterias Gram-positivas, fueron recientemente descritas también en los camarones *L. vannamei* y *L. setiferus*, especies en las cuales se han propuesto como inhibidores de proteasas (Bartlett and Guillaume, 2004).

### ***Fagocitosis***

La fagocitosis, es el principal mecanismo de eliminación de bacterias, esporas y células envejecidas del propio organismo (McCumber *et al.*, 1979; Tyson and Jenkin, 1974). Los mecanismos de reconocimiento del material fagocitado no se han identificado plenamente, aunque se ha sugerido la participación de lectinas séricas y de membrana que reconocen azúcares específicos, aglutinan bacterias o bien funcionan como opsoninas facilitando la fagocitosis (Bayne, 1990; Vázquez *et al.*, 1997a). En *Penaeus merguinaensis*, la

fagocitosis de bacterias se efectúa por hemocitos, los cuales desgranulan 30 minutos después del primer estímulo, se ha demostrado la participación de lectinas en el proceso de reconocimiento celular (Lee *et al.*, 2001).

### **Lectinas**

Las lectinas son proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza que tienen la propiedad de reconocer de manera específica carbohidratos en la superficie de membranas o de la pared bacteriana e inducir aglutinación, así como activar otros eventos celulares como la fagocitosis, en donde podrían estar actuando como opsoninas (Bayne,1990). Las funciones naturales de las lectinas no están completamente esclarecidas, sin embargo, la interacción entre lectinas y carbohidratos ha permitido demostrar que están involucradas en diversos procesos biológicos, incluyendo el transporte de carbohidratos, glicoproteínas y calcio en las células y tejidos (Goldstein *et al.*, 1980; Komano and Natori,1985; Vasta, 1992). Se ha sugerido que las lectinas pueden participar como factores citolíticos y citotóxicos (Armstrong *et al.*, 1996), en la adhesión celular, migración y apoptosis (Kasai *et al.*,1996; Ni *et al.*, 1996; Perillo *et al.*, 1995; Peters *et al.*,1983; Vasta, 1999)

La presencia de lectinas se ha confirmado en todas las especies de crustáceos decápodos estudiadas, se ha identificado además que las lectinas pueden estar presentes tanto en la membrana y gránulos citoplasmáticos de los hemocitos, como en forma soluble en la hemolinfa. Sugiriendo diversidad de funciones para estas moléculas ya que en ese caso la lectina de membrana participa en el reconocimiento de moléculas extrañas y como posible mediadora de la activación y cooperación celular, mientras que la lectina soluble participa en

el transporte de carbohidratos (Mullainadhan *et al.*, 1986; Vázquez *et al.*, 1997b) (Figura 2). Mediante ensayos *in vitro*, se ha demostrado que la especificidad de las lectinas en decápodos esta dirigida principalmente hacia carbohidratos N-acetilados como ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico, NeuAc), N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc). La mayoría de las lectinas reportadas en este grupo son dependientes de calcio y/o magnesio, aunque, las lectinas del suero de *P. indicus* (Mashewari *et al.*,1997) y de *P. paulinensis* (Marques and Barraco, 2000) no requieren de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) para su actividad. (Tabla 1)

Las lectinas identificadas en el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, en los cangrejos *Cancer antennarius* y *Liocarcinus depurator* poseen especificidad por residuos de ácido siálico sustituidos por grupos O-acetilados en el carbono 4 o 9 (Fragdiakis *et al.*, 1997; Ravindranath *et al.*, 1985; Vázquez *et al.*, 1993). Esto sugiere que la especificidad se ha conservado evolutivamente en crustáceos decápodos, aunque, no es constante entre los invertebrados ya que en los moluscos se ha observado que -a diferencia de los crustáceos- las lectinas reconocen un amplio espectro de carbohidratos (Arreguin-Espinosa *et al.*, 1997; Renwranz, 1986; Vasta *et al.*,1992).

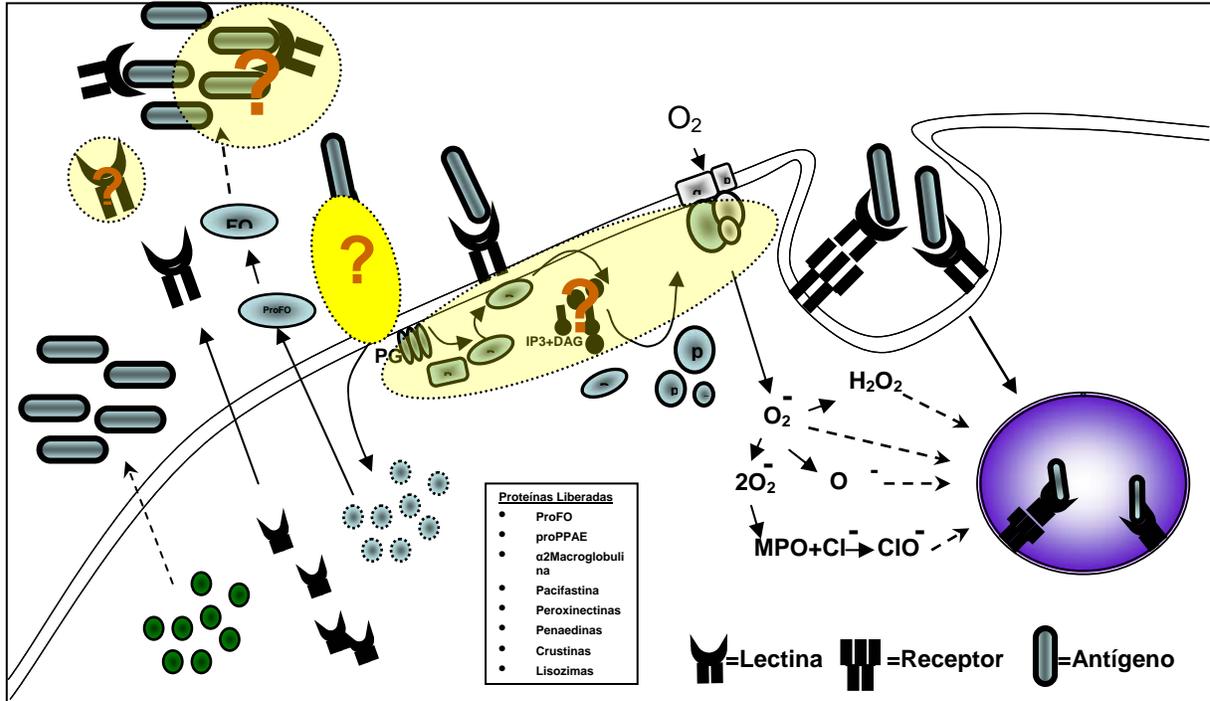


Figura 4.- Mecanismos de inmunidad mediados por lectinas a estudiar en *L. setiferus*.

La capacidad de reconocer específicamente estructuras sacarídicas permite a los crustáceos identificar y aglutinar diversas bacterias que poseen estos determinantes antigénicos en la pared o en la cápsula. Por ejemplo la identificación de los residuos de carbohidratos O-acetilados de *Aeromonas* sp y *Bacillus cereus* por la lectina del langostino *M. rosenbergii* (Vázquez *et al.*, 1996) o la identificación de lipopolisacáridos de bacterias por las lectinas de *Carcinoscorpius rotunda cauda*, *Parapenaeus longirostris*, *Litopenaeus shmitti* y *Penaeus californiensis* (Cominetti *et al.*, 2002; Dorai *et al.*, 1982; Fragdiakis *et al.*, 1995; Vargas-Albores *et al.*, 1993).

Las lectinas de crustáceos reportadas hasta ahora, muestran gran heterogeneidad en el peso molecular y en el número de subunidades que la conforman. La lectina purificada a partir de la hemolinfa de *P. californiensis*, BSH-

1, se reportó como un oligómero de 175 kDa, con subunidades de 41 kDa (Vargas-Albores, *et al.*, 1993), mientras que la Monodina de *P. monodon*, se reportó con un peso molecular de 420 kDa, y subunidades de 27 kDa (Ratanapo and Chulavnatol, 1990). En *Parap*

*enaeus longirostris* se describieron 3 lectinas de 440 kDa, con subunidades que oscilan en el rango de 16 a 210 kDa (Fragdiakis *et al.*, 1995), mientras que en *Litopenaeus schimitti* se reportó una lectina multimérica de 220 kDa con subunidades de 31 y 34 kDa (Cominetti *et al.*, 2002).

En otros crustáceos como el langostino *M. rosenbergii* se reportó la existencia de 5 isoformas de la lectina sérica (isolectinas), las cuales se encuentran en proporciones variables y que poseen además capacidades aglutinantes diferentes, estas diferencias están aparentemente asociadas a los estadios de vida. Por cromatoenfoco se comprobó que en estadios juveniles hay cuatro isoformas, mientras que en adultos, solo hay una. La única diferencia significativa entre las lectinas purificadas a partir de organismos juveniles y adultos está en el porcentaje de glicosilación y sialilación, lo que determina que la concentración de carbohidratos disminuye en relación directa al desarrollo del langostino. Esta información confirma que las lectinas pueden experimentar cambios postraduccionales y permite suponer que las lectinas pueden variar de acuerdo con estadio de vida de los organismos. (Agundis *et al.*, 2000; Sierra *et al.*, 2003).

**Tabla 1.- Características químicas de las lectinas de camarones peneidos reportadas.**

Especie	Dependencia	Peso Molecular (kDa)		Especificidad	Referencia
		Nativo	Subunidad		
<i>P. japonicus</i>	Ca <sup>2+</sup>	330	33	GlcNAc, GalNac, NeuAc, Rib, MSB, MEP, Fet	Kondo <i>et al.</i> , 1992, 1998.
<i>P. indicus</i>	No	ND	ND	GlcNAc, GalNac, NeuAc, MSB, MEP, Fet	Mashewari <i>et al.</i> , 1997.
<i>P. californensis</i>	Ca <sup>2+</sup>	175	41	GlcNAc, GalNac, ManAc	Vargas-Albores <i>et al.</i> , 1993,1995.
<i>P. stylirostris</i>	Ca <sup>2+</sup>	30		NeuAc, MSB , Fet, LSP	Vargas-Albores <i>et al.</i> , 1993.
<i>P. monodon</i>	Ca <sup>2+</sup>	420	27	GlcNAc, GalNac, NeuAc, MSb, Fet, LSP	Ratanapo and Chulavatnatol 1990, 1992.
<i>P. paulinensis</i>	No	153	31	GlcNAc, GalNac, NeuAc, Fet, LSP	Marques <i>et al.</i> , 2000.
<i>P. schmitti</i>	No	153	31 / 34	GlcNAc, GalNac, Fet, ManAc	Cominetti <i>et al.</i> , 2002.
<i>P. longirostris</i>	Ca <sup>2+</sup>	440	27	GalNac, NeuAc, Fet, LSP, Gal	Fragkiadakis and Stratakis, 1995.
<i>F. chinensis</i>	Ca <sup>2+</sup>	ND	ND	Gal	Liu <i>et al.</i> , 2007.

GlcNAc: N-Acetil Glucosamina, GalNac: N-Acetil Galactosamina, NeuAc: Acido Siálico, Rib: Ribosa, MSB: Mucina Submaxilar Bovina, MEP: Mucina Estomacal Porcina, Fet: Fetuina, ManAc: N-Acetil manosa, LSP: Lipopolisacaridos, Gal:Galactosa, ND: No Determinado.

## Justificación

Las lectinas son proteínas de gran relevancia en la inmunidad innata, las lectinas identificadas en peneidos participan, mediante el reconocimiento de carbohidratos acetilados, al reconocimiento de patógenos, sin embargo no se ha identificado plenamente su participación en la activación de los mecanismos de la respuesta inmune. Diversos trabajos han demostrado la participación de las lectinas de crustáceos dulceacuícolas en la fagocitosis y activación de células fagocíticas para la producción de radicales libres de oxígeno (ROIs), sugerido un mecanismo de regulación para esta proteína (Pereyra *et al.*, 2004), pero se desconoce la existencia de mecanismos parecidos en crustáceos marinos. En crustáceos decápodos se ha demostrado que comparten características, como el reconocimiento hacia carbohidratos acetilados, la dependencia de cationes divalentes y capacidad de opsonización de bacterias, sin embargo, su participación en fagocitosis, y producción de ROI, estructura primaria y secundaria, ligandos y receptores, todavía no se han caracterizado en crustáceos. El presente estudio pretende la caracterización bioquímica de la lectina del camarón blanco del Golfo de México *L. setiferus* y la determinar su participación en la activación de los mecanismos defensa, lo que permitirá esclarecer la función de las lectinas en el sistema inmunológico de los camarones peneidos.

## Hipótesis

La lectina sérica de *Litopenaeus setiferus* conserva las características observadas en otros crustáceos, por lo que participa en el reconocimiento de epítopes antigenicos y podría al mismo tiempo activar mecanismos de defensa, mediante su unión a receptores de membrana.

## **Objetivo General**

Caracterizar bioquímicamente y determinar la participación de la lectina sérica en los mecanismos de defensa en el camarón blanco del Golfo de México *L. setiferus*.

## **Objetivos Particulares**

1. Purificar y caracterizar a la lectina sérica de *L. setiferus*.
2. Identificar la especificidad de la lectina por carbohidratos y por grupos celulares
3. Identificar una posible función de la lectina sérica: la capacidad de identificar células no propias, mediante aglutinación o mediante el reconocimiento de grupos celulares propios que participen en los mecanismos de defensa.
4. Identificar y caracterizar el receptor para LsL en hemocitos del mismo organismo.

## **Metas**

1. Determinar la especificidad hacia eritrocitos de la lectina en la hemolinfa de *L. setiferus*.
2. Purificar una lectina del suero de hemolinfa del camarón *L. setiferus* .
3. Caracterizar químicamente la proteína purificada (peso molecular, número de subunidades, estructura primaria y secundaria).
4. Determinar especificidad hacia azúcares y glicoproteínas.
5. Determinar dependencia de cationes.
6. Determinar las condiciones particulares de activación del estallido respiratorio por lectina.
7. Identificar por microscopía confocal las poblaciones celulares que poseen receptores para LsL.
8. Caracterizar a los receptores en hemocitos.
9. Establecer mediante análisis bioinformáticos la relación entre la lectina y la hemocianina.

## **Materiales y métodos**

### ***Organismos.***

Se utilizaron organismos adultos machos, en estadio de intermuda de *Litopenaeus setiferus* provenientes de las poblaciones silvestres de la plataforma continental adyacente a la Laguna de Términos, Campeche. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura, oxigenación, y salinidad durante 3 semanas antes de su utilización para reducir el estrés producido por la captura. Se utilizaron tanques negros ovalados de 9 m<sup>2</sup> de superficie acondicionados con flujo continuo de agua de mar y aireación. Para evitar las alteraciones en la respuesta inmune, antes de obtener la muestra, los animales fueron mantenidos por 5 min en agua de mar a 15°C, la hemolinfa fue extraída por punción del seno pericardial, en la base del primer segmento abdominal utilizando una aguja de 21g x 32mm y colocada en tubos de plástico estériles.

### ***Preparación del Suero***

Para obtener el suero, se permitió la coagulación de la hemolinfa durante 24 h a 4 °C, posteriormente, se centrifugó a 300 x g a 4°C por 10 min, y el suero sobrenadante fue dializado exhaustivamente contra agua destilada, posteriormente fue y almacenado a -70 °C, hasta su análisis.

### ***Obtención de hemocitos***

Para ensayos biológicos en los que se usaron células, la hemolinfa fue colectada en una solución de Alsever (100 mM glucosa, 20 mM NaCl, 30 mM Citrato de Sodio, pH 7.4) en proporción 2:1, posteriormente fue centrifugada a 300 x g en 3 ocasiones. El botón celular se resuspendió en medio de cultivo estéril

RPML 40 ajustando la osmolaridad con 400 mM de NaCl y se contaron las células totales en un hematocitómetro.

### ***Purificación de la lectina.***

Para la purificación de la lectina (LsL), el suero fue centrifugado a 300 x g durante 10 min, 200  $\mu$ L del mismo se aplicaron a una columna conteniendo estroma de eritrocitos de conejo físicamente atrapados en Sephadex G-25 superfino (Pharmacia Chemicals, Upsala, Sweden), equilibrada previamente con PBS. La fracción no retenida fue lavada con PBS y la lectina eluida de la matriz de afinidad por la adición de ácido acético al 3% de acuerdo con método descrito por Vázquez *et al.*, (1993). El flujo de la columna fue de 20 ml/h, fueron colectadas fracciones de 1 ml y determinada su densidad óptica (DO) a 280 nm. La fracción retenida se dializó contra PBS y determinó su actividad aglutinante con eritrocitos de conejo. Las muestras se mantuvieron a  $-70$  °C hasta su análisis posterior.

### ***Determinación de proteína y carbohidratos.***

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford, (1976) utilizando azul de coomasie G-50, con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La cuantificación de carbohidratos se realizó por el método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), con glucosa como estándar.

### ***Determinación del peso molecular de la lectina***

El grado de homogeneidad de la lectina obtenida por cromatografía de afinidad fue evaluada por electroforesis de acuerdo con método descrito por Laemmli, (1970), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% y Dodecil sulfato de

sodio (SDS-PAGE). Las muestras conteniendo entre 10 a 75  $\mu\text{g/ml}$  de lectina fueron mezcladas en proporción 1:1 en amortiguador de muestra (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, beta-mercaptoetanol 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8). Posteriormente fueron sometidas a ebullición por 10 min. Se emplearon estándares de peso molecular (PM) conocido, con un rango de 6.5 a 200 kDa (BioRad, Richmond CA, USA). La migración electroforética fue realizada aplicando voltaje constante de 100V, utilizando amortiguador de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192, y SDS 0.1%, pH 8.3). Los Rf de los estándares fueron calculados con la formula:  $R_f = \text{distancia de migración de la proteína} / \text{distancia de migración del colorante}$ . Los pesos moleculares de las subunidades de la lectina fueron calculados en la gráfica de PM vs. Rf, interpolando los valores del Rf de las subunidades de lectina y de las subunidades.

### ***Peso molecular nativo***

Para determinar el peso molecular nativo de la lectina, 500  $\mu\text{g}$  de lectina se aplicaron a una columna de filtración en gel (1.6 x 100 cm, Pharmacia, Upsala, Suecia) conteniendo Sephacryl S-300 conectada a un equipo de cromatografía líquida de alta presión (FPLC), la columna se equilibró previamente con PBS y posteriormente con marcadores de pesos moleculares nativos (Sigma), el flujo fue de 12 ml/h se colectaron fracciones de 1 ml monitoreando la DO a 280 nm. El peso nativo de la fracción de lectina fue obtenida mediante la relación  $K_{av}/M_r$ , en donde  $K_{av}$  esta dada por los tiempos de elusión y  $M_r$  es la masa relativa de los estándares de pesos moleculares conocidos.

### ***Composición de Aminoácidos***

La fracción purificada por cromatografía de afinidad fue sometida a hidrólisis en vacío con ácido clorhídrico (HCl) 5 N a 110°C durante 48 h en tubos sellados herméticamente. Las muestras fueron examinadas en un analizador automático de aminoácidos Mod. Durrum 500 de acuerdo con método de Bildlingmeyer *et al.*, (1984), utilizando norleucina como estándar interno.

### ***Composición de carbohidratos.***

Fue realizado mediante cromatografía de gases de acuerdo con método de Zanetta *et al.*, (2001). La muestra purificada por cromatografía de afinidad, fue sometida a un proceso de hidrólisis con metanol/HCl 5 N durante 24 h a 100°C. La muestra se dejó enfriar y fue neutralizada con AgNO<sub>3</sub>, pH 6.0. Posteriormente reacetilada con anhídrido acético en oscuridad absoluta durante toda la noche y se procedió a extraer los ácidos grasos con heptano. La muestra fue secada con una corriente de N<sub>2</sub>, resuspendida en piridina y fue realizada la derivación de los alditos liberados con trifluoroacético. El análisis de los derivados trifluoro-acetil alditos fue realizada en un cromatógrafo de gases mod. Varian 2100 (Orsay, France) equipado con un detector de flama.

### ***Análisis Proteómico***

Después de la electroforesis, las bandas conteniendo las fracciones de proteína, fueron retiradas del gel con una hoja de bisturí y sometidas a hidrólisis con 0.05 mg de tripsina en 500 ml de bicarbonato de amonio, pH 8.0 por 24 h, 37°C. La actividad enzimática fue inhibida manteniendo la mezcla a 2°C por 4 h. La enzima y la muestra digerida fueron secadas por evaporación usando un

Gyrovap (Howe, Londres) y preparadas mezclando directamente en la matriz 1 ml del producto de reacción (50 pM) y 1 ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, se dejó cristalizar la mezcla a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos fueron determinados por tiempo de vuelo, en un espectrofotómetro de masas Visión 2000 (MALDI-ToF, Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa fueron determinados en modo reflectrón bajo 8 keV de voltaje de aceleración y detección positiva. Como control fue usado Tripsina para identificar los péptidos libres y Angiotensina como estándar (Mr 296.7). Las masas de los iones digeridas fueron comparadas en la base de datos NCBItr (Profound 2005/03/06)

#### ***Determinación de la secuencia NH<sub>2</sub>-terminal.***

La secuencia NH<sub>2</sub>-terminal de LsL fue determinada por degradación automatizada de Edman. Las subunidades identificadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membrana poli-fluoruro de vinilideno (PVDF, BioRad Richmond, CA, USA). La micro secuencia fue determinada usando un secuenciador de proteínas Porton-Beckman LF-300 equipado con un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, Pharmacia, Upsala, Suecia). Para la obtención de péptidos internos fue aislada la banda de 85 kDa de un gel SDS-PAGE y sometida a hidrólisis con 0.05 mg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0 por 24 h y 37°C. La actividad enzimática fue inhibida manteniendo la mezcla a 2°C por 4 h, posteriormente los péptidos obtenidos fueron separados en otro gel SDS-PAGE y procesados por degradación automatizada de Edman.

#### ***Estructura secundaria determinada por dicroísmo circular***

La muestra de lectina purificada se sometió a análisis de dicroísmo circular, en un espectro polarímetro JASCO J-700. La concentración de proteína fue 300 µg de LsL/ml en amortiguador de fosfatos y el rango de lectura fue 180 a 240 nm en celdas de 5 mm.

### ***Actividad hemaglutinante***

Eritrocitos de diferentes especies de animales fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM, y colocados en una solución anticoagulante estéril de Alsever, lavados 4 veces a 300 x g 10 min con amortiguador salino-fosfatos PBS (0.01 M de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, 15 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7.4). La actividad hemaglutinante fue medida por dilución seriada en microplacas con fondo en U (NUNC, Dinamarca), utilizando 30 µl de hemolinfa más 30 µl de una suspensión de eritrocitos al 2% en PBS. Los resultados están expresados como el inverso del título de aglutinación. (Título de aglutinación: la dilución del último pozo con actividad aglutinante visible a 90 min de la reacción)

### ***Especificidad por Carbohidratos.***

La especificidad de la lectina fue determinada por ensayos de inhibición de la actividad aglutinante en presencia de varios carbohidratos y glicoproteínas. Los inhibidores (Sac, Fuc, Gal, Glc, Gal-NH<sub>2</sub>, Glc-NH<sub>2</sub>, GalNAc, GlcNAc, IgA, IgG, NeuAc, Fet, MSB, MEP) fueron diluidos en forma seriada con PBS e incubados con un volumen igual de lectina por 30 min a 37 °C con posterior adición de eritrocitos de conejo al 2%. La capacidad de inhibición fue expresada como la concentración mínima de azúcar requerida para inhibir 4 unidades hemaglutinantes UHA (Vázquez *et al.*, 1997).

### ***Dependencia por Cationes Divalentes***

La dependencia por cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ ) fue medida por hemaglutinación con eritrocitos de conejo (2%). La lectina fue dializada con EDTA 0.1 M en ácido acético 0.1 N durante una noche a 4°C y posteriormente la lectina fue dializada contra agua destilada. Alícuotas de la lectina (30µg) fueron incubadas con diversas concentraciones de cationes ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ , de 200 a 1 mM en PBS) durante 30 min a 37°C, y posteriormente se realizaron los ensayos de actividad aglutinante utilizando una suspensión de eritrocitos de conejo al 2% en PBS. Los títulos de actividad se compararon con una alícuota de lectina que se dializó contra agua destilada.

### ***Determinación del estallido respiratorio***

Para el ensayo del estallido respiratorio fueron utilizadas monocapas de hemocitos y NBT-zymosan; con este propósito fueron incubadas NBT 0.2% (Sigma) en PBS con Zymosan-A 0.1% (Sigma) 2h a 37°C. La monocapa de hemocitos, ( $5 \times 10^5$  células/pozo en medio de cultivo) fue incubada con 100 µl de NBT-Zymosan. Posteriormente, las placas fueron lavadas con PBS y metanol al 70%. Añadiéndoles en seguida 120 µl de KOH 2 M y 140 µl de dimetil sulfoxido/pozo (Rook *et al.*, 1985), para solubilizar los depósitos de formazán, producidos por el  $\text{O}_2^-$  intracelular. La coloración obtenida fue determinada a 630 nm en un lector de ELISA (Labsystems, Multiskan MS, Finlandia), usando una solución de NBT como blanco. La reducción de NBT fue reportada como nM de NBT reducido (NBTr/monocapa), considerando que el coeficiente de extinción molar de NBTr es de 0.1 DO a 630 nm y representa 1.9 nM de  $\text{O}_2^-$  (Rojas *et al.*,

2001). La influencia de LsL en el estallido respiratorio fue determinada añadiendo la lectina en diferentes concentraciones a la monocapa de hemocitos (0.1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Los controles contenían PMA 10  $\mu\text{g/ml}$  (Rojas *et al.*, 2001).

### ***Microscopia de fluorescencia***

Los hemocitos en solución fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS por 3 h y bloqueados por 30 min con BSA libre de IgG (Sigma) al 5% en PBS. Los hemocitos fijados y bloqueados fueron lavados con Tritón X-100 al 0.2% (Sigma) en PBS (PBS-T) y se incubaron con LsL, previamente acoplada con NSH-LC-biotina (Sigma, Savage *et al.*, 1992) (LsL-Biotina; 3  $\mu\text{l}$  en PBS por 2h a 37°C). Las muestras se lavaron con PBS e incubadas con Extravidina-FITC 1:60 (Sigma), 1h a 37°C. Posteriormente, lavadas con PBS y montadas en Vectashield (VECTOR Laboratories. Burlingame). Los hemocitos marcados fueron observados en un microscopio invertido BioRad 1024 equipado con sistema de epi-iluminación (Vázquez *et al.*, 1993). Los controles se realizaron incubando a la lectina previamente con mucina submaxilar bovina (10 mM). En este control la tinción de los hemocitos fue negativa.

### ***Inmunoelectrotransferencia***

Los hemocitos  $1 \times 10^6$  fueron incubados en una solución de lisis (100  $\mu\text{l}$  de inhibidores de proteasas, PMSF y 1% de triton X-100) 30 min a 4°C en agitación constante, posteriormente se centrifugaron a 300 g por 30 min para eliminar los residuos celulares y sometidas a SDS-PAGE. Después de la electroforesis, cada gel fue incubado 1 h en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, y metanol 20%, pH 8.3) y transferido a membranas de nitrocelulosa en un aparato Trans-Bolt SD Semi Dry Transfer Cell (Bio Rad) a temperatura

ambiente con voltaje constante 25 V, 1h. Los sitios libres se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS, 1.5 h, luego, fue añadido LsL-peroxidasa, incubando 12 h, 4°C y 1.5 h a 37 °C. Las membranas fueron lavadas 4 veces con PBS-T por 10 min Las membranas fueron reveladas con el sustrato de la enzima (4-cloro-1-naftol 0.05%, metanol 20 %, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.015% en PBS pH 7.2), con agitación ligera, a 25°C, hasta la aparición de las bandas. La reacción fue detenida con agua destilada. Las marcas de los pesos moleculares fueron teñidas con colorante rojo de Ponceau (Sigma).

### ***Análisis bioinformáticos de la Lectina.***

La secuencia de aminoácidos de LsL, fue comparada para buscar homologías y/o similitudes en la base de datos de NCBI. Las secuencias de proteínas con más del 70% de similitud fueron analizadas con alineamientos múltiples (ClustalW, EMBnet-CH). Los resultados son mostrados en gráficos agrupados por secuencias con mayor similitud.

### ***Análisis estadístico***

Los resultados representan el promedio  $\pm$  DS de los experimentos, realizados por triplicado. A los resultados se les aplicaron estadísticas paramétricas y usando el software Sigma Stat V 2.0 (Jandel Scientific, CA, USA) y las diferencias estadísticas en los resultados se consideraron como significativos con  $p < 0.05$  y  $p < 0.025$ , en la comparación con lo controles respectivos.

## Resultados

### ***Organismos.***

En el presente estudio fueron utilizados organismos adultos machos capturados en las costas del estado de Campeche, en estadio de muda C (intermuda). El peso promedio fue de 23.4 g  $\pm$ 4.68, y la talla de 15.3 cm  $\pm$ 1.01. Los organismos fueron mantenidas en estanques de aclimatación, se les extrajo 1 ml  $\pm$ 0.3 de hemolinfa por organismo, se permitió la coagulación espontánea centrifugando posteriormente para separar el suero, las proteínas totales fueron de 215 $\pm$ 45 mg/ml, el resto del suero distribuido en alícuotas de 1ml, las cuales fueron mantenidas a -70° C hasta su uso. De los organismos utilizados para análisis inmunológicos se obtuvieron 3,000,000  $\pm$ 2500 células/ml.

### ***Purificación de lectina.***

La lectina del suero de camarón adulto *Litopenaeus setiferus* se purificó por cromatografía de afinidad, a partir de 200 mg de proteína total, se obtuvieron 2.7 mg de lectina. La actividad específica se incrementó 508 veces en relación con la encontrada en el suero (Tabla 2). La fracción no retenida carecía de actividad aglutinante (Figura 5).

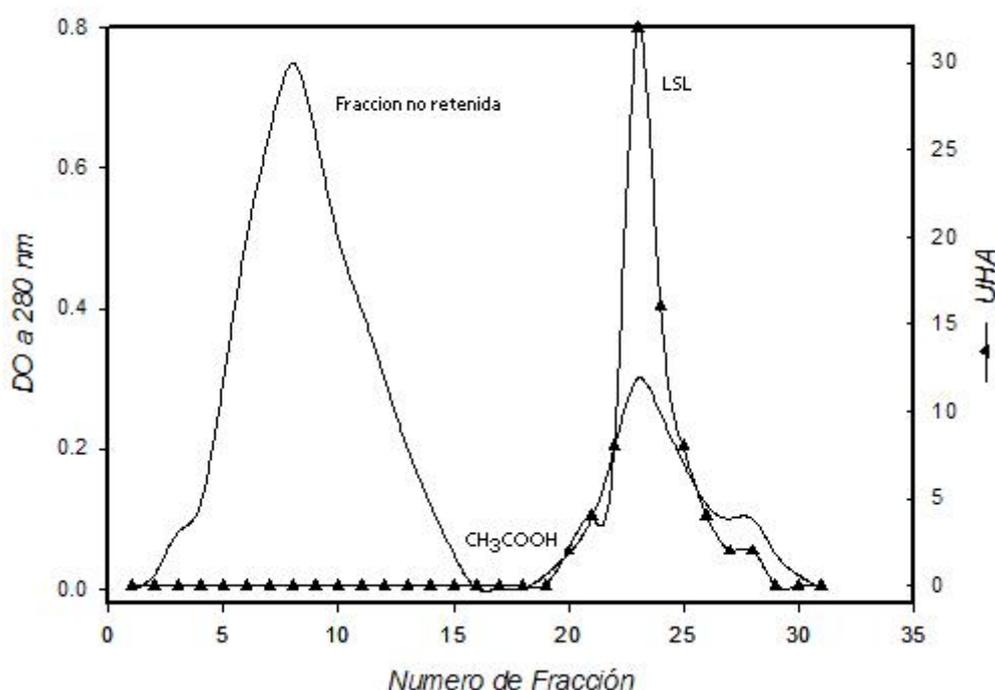


Figura 1. Perfil de elución de LsL de suero de organismos adultos por cromatografía de afinidad utilizando una columna (0.6 x 10 cm) con estroma de eritrocitos de conejo .. La lectina fue eluida adicionando ácido acético al 3% en agua. A cada fracción de 1 ml se le determinó absorbancia a 280 nm (—) y actividad hemaglutinante, reportada como el número de unidades hemaglutinantes (UHA), en presencia de eritrocitos de conejo al 2% (▲), a las fracciones eluidas con ácido acético se les ajustó el pH a 6 con NaOH 1M previo al ensayo de aglutinación.

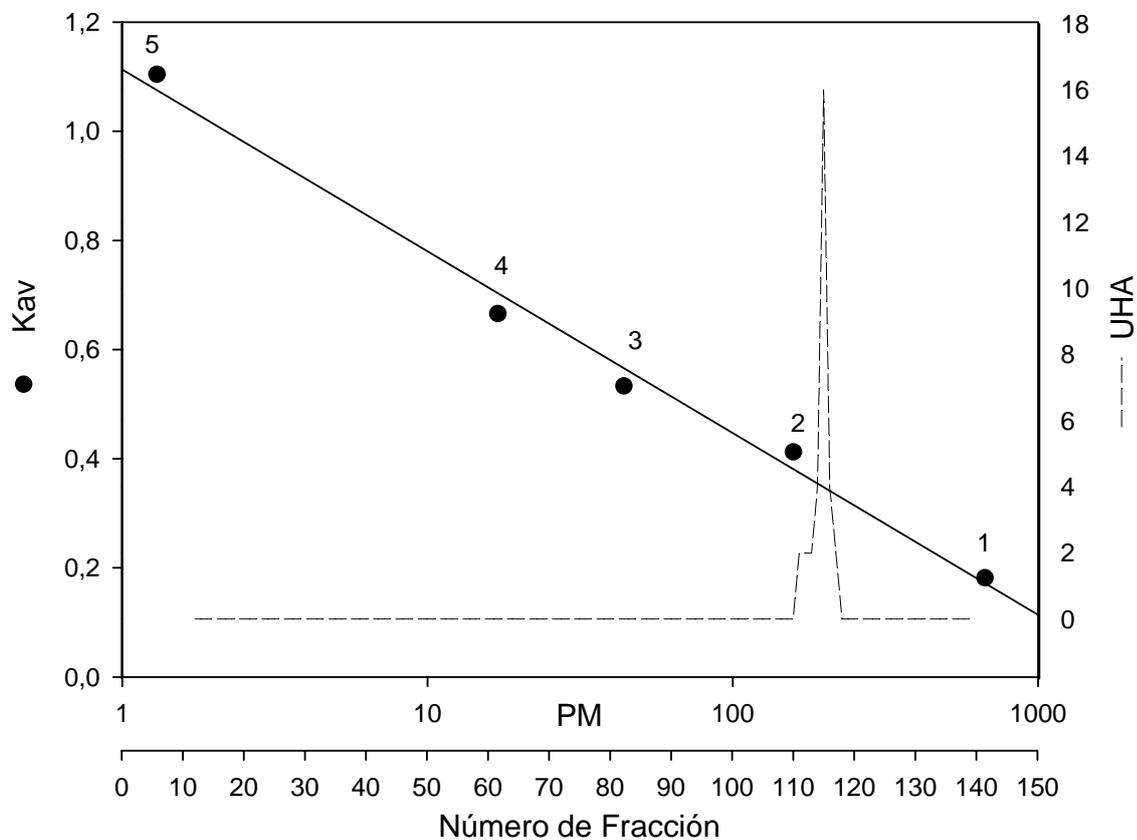
Tabla 1. Proceso de purificación de la lectina LsL por cromatografía de afinidad.

Fracción	Proteína Total (mg).	UHA*	Actividad Específica**
Hemolinfa	200	12,800	64
Fracción NR	52.5	0	0
LsL	2.7	87,804	32,520

\*Inverso del título de aglutinación en presencia de eritrocitos de conejo. \*\*UHA/ mg de proteína. Datos obtenidos a partir de 1 ml de suero.

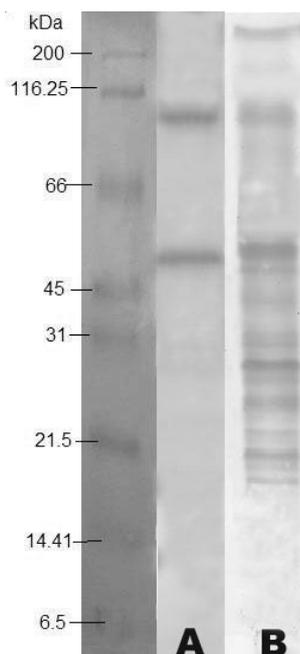
### Caracterización química de la lectina.

El peso molecular de LsL purificada por cromatografía de afinidad fue determinado por cromatografía de filtración utilizando Sephacryl S-300, este ensayo nos permitió determinar que la proteína tiene un peso molecular nativo de 290 kDa (figura 6).



**Figura 2.- Determinación del peso molecular de la lectina LsL en condiciones no desnaturizantes por cromatografía por filtración en Gel. Los marcadores de peso molecular fueron: 1. Tiroglobulina bovina (670 kDa); 2. gamma-globulina bovina (158 kDa) 3. ovalbúmina (44 kDa); 4. mioglobina (17 kDa); 5. vitamina B-12 (1.35 kDa).**

El análisis electroforético de la hemolinfa revela múltiples bandas, la de mayor concentración, corresponde a la hemocianina (Figura 7b). En tanto que la lectina purificada está constituida aparentemente por 2 subunidades de 80 y 52 kDa respectivamente (Figura 7a).



**Figura 3.** Perfil electroforético de la lectina LsL en SDS-PAGE al 10% de A ) 10 µg de LsL purificada por cromatografía de afinidad, B ) 50 µg hemolinfa de *L. setiferus*. Marcadores de peso molecular: Miosina (200 kDa), β-galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica de bovino (29 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y apoproteína (6.5 kDa.)

### **Composición de Aminoácidos.**

La lectina purificada esta principalmente constituida por Gly, Asx, Glx y Ala, con más de 200 residuos por Mol, en menor proporción contiene Metionina con 23 y Cys con 3.3 res/mol respectivamente (Tabla 3). LsL es una proteína que no tiene carbohidratos en su composición de acuerdo al análisis determinado por cromatografía de gases.

**Tabla 2.- Composición de Aminoácidos de LsL.**

<b>Residuo</b>	<b>Res/Mol*</b>	<b>Residuo</b>	<b>Res/Mol*</b>
Asx	283.45	Pro	126.08
Glx	225.09	Thr	115.51
Leu	188.61	Ile	92.31
Gly	320.93	His	78.01
Lys	132.88	Arg	66.33
Phe	117.4	Tyr	44.7
Ala	212.7	Met	23.33
Val	157.14	Cys	3.35
Ser	172.34		

\*Residuo/Mol, considerando un PM de 291 kDa.

### **Análisis proteómico por MALDI-TOF**

La digestión triptica de las subunidades de la lectina obtenidas por una separación electroforética y analizados por MALDI TOF, arrojó un total de 96 péptidos para la subunidad de 85 kDa con un rango de masas de 768.36 a 3379.76 y para la subunidad de 52 kDa 768.36 a 3267.62, éstas masas se compararon con la base de datos de NCBI nr (Profound 2003/08/06). De los 96 péptidos obtenidos, solamente 13 de ellos presentan una alta similitud con un precursor de la hemocianina de *L. vannamei* (Tabla 4).

**Tabla 3. Péptidos de la lectina de *Litopenaeus setiferus* identificados por MALDI-TOF.**

<b>m/z</b>	<b>Subunidad</b>	<b>Residuo No*</b>	<b>Secuencia de Péptido</b>
767.360	I, II	391-396	DPSFFR
1090.540	I, II	566-575	FESATGLPNR
1090.614	I, II	635-633	LNHKEFTFR
1109.573	I	469-477	RPGHGYPLDR
1206.593	I	84-92	<u>HWFSLEFNTR</u>
1598.837	I, II	478-492	IDVENNGAERLATVR
1758.847	I, II	109-123	<u>DWASFVGNAAAYFRQK</u>
1827.915	I	375-390	FDLPPGVLEHFETATR
1910.990	II	230-244	KGENFFWIHHQLTVR
2408.117	I, II	230-244	IFAWPHKDNNGIEYTFDEGR
2494.187	I, II	278-299	YGGQFPARPDNVKFEDVDDVAR
2547.249	I, II	368-390	QGDPHGKFDLPPGVLEHFETATR
3296.649	II	250-277	LSNYLDPVDELHWEKPIVQGFAPHTTYK

*Las subunidades I y II corresponden a las fracciones de 85 y 52 kDa identificadas por SDS-PAGE de la lectina, respectivamente. \* Los residuos de aminoácidos está numerados de acuerdo con las secuencia de aminoácidos del precursor de hemocianina de L. vannamei, con mayor similitud con los péptidos de LsL. Las secuencias subrayadas corresponden a los dominios de tipo Ig.*

### **Secuenciación de la porción -NH<sub>2</sub>.**

Muestras de lectina aisladas de sueros provenientes de organismos diferentes se separaron electroforéticamente y fueron transferidas a membranas de PVDF. Las bandas de 85 kDa fueron eluidas y sometieron a secuenciación por degradación automatizada de Edman. Se obtuvo una secuencia ligeramente diferente para cada muestra (Tabla 5). A partir de las secuencias obtenidas se obtuvo una secuencia consenso, que fue comparada en la base de datos nr del NCBI, en todos los casos se obtuvo una similitud > 85% con la secuencia de la hemocianina de *L. vannamei* en la región del residuo 25 al 43.

**Tabla 4. Alineamiento de Secuencias Múltiples (Clustal W) N-terminales de LsL, de cuatro muestras diferentes.**

1	DASNAQKQHVDVNFL-----
2	---DAQHQKDVLFLHKKIYGDIQ
3	---DAQLQK-----
4	---DAQHQKDVLFLLDN-----
	: * * : *

**\* aminoácidos iguales en las cuatro secuencias.**

### **Secuencias internas de LsL.**

A partir de la subunidad de 85 kDa, aislada de un gel de electroforesis y sometida a digestión enzimática fueron purificadas dos péptidos internos de 11 y 13 kDa por SDS PAGE (Tabla 6)

**Tabla 5. Secuencias de péptidos internos de la subunidad de 85 kDa de LsL.**

R	V	A	Y	F	G	E	D	I	G	X	N	T
K	G	N	E	Q	G	L	E	F	D	L	V	V

### **Estructura secundaria por Dicroísmo Circular.**

La determinación de estructura secundaria de LsL se realizó por dicroísmo circular, según análisis, la proteína esta formada por hojas beta plegadas en un 52.7 % y un 6.1 % de alfa hélices. (Figura 8).

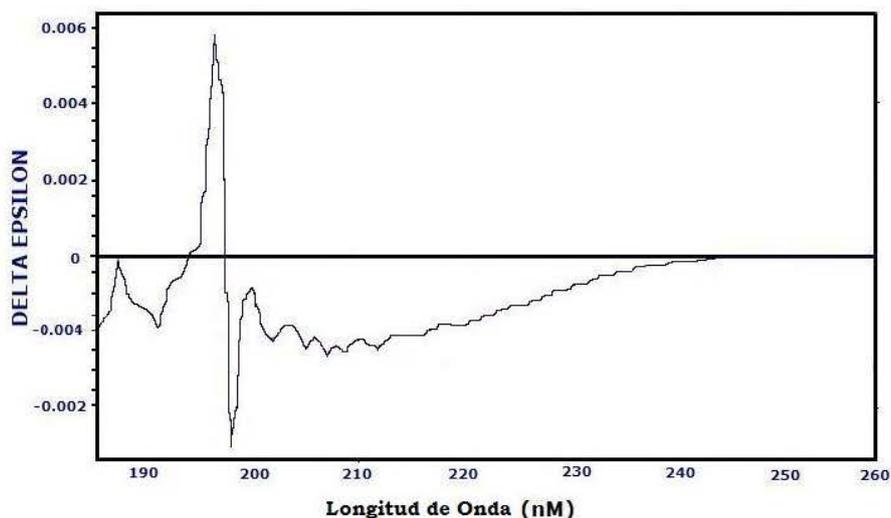


Figura 4.- Estructura secundaria de la lectina LsL por dicroísmo circular.

### ***Actividad Hemaglutinante.***

La lectina aglutinó preferentemente eritrocitos de conejo y ratón, esta actividad fue 512 y 128 veces mayor que hacia los eritrocitos de conejo y ratón respectivamente, que hacia los de humano tipo O. El título disminuye cuando los eritrocitos se tratan con sialidasa. La concentración mínima inhibitoria de lectina fue de 3.7 µg/ml (Tabla 7).

### ***Especificidad por carbohidratos.***

La especificidad de la lectina por carbohidratos y glicoproteínas fue determinada mediante ensayos de inhibición de la aglutinación, manteniendo constante la concentración de lectina considerando un título de 1:4 en presencia de eritrocitos de conejo. De los monosacáridos, la Gal y la glucosamina (GlcNH<sub>2</sub>) inhiben la actividad aglutinante, sin embargo los carbohidratos N-acetilados como GalNAc, GlcNAc y NeuAc fueron mejores inhibidores de la actividad aglutinante. De las glicoproteínas IgA resulto ser el inhibidor más potente ya que solamente se

requieren 3  $\mu$ M para inhibir 4 UHA; (~17,000 veces más potente que la galactosa). (Tabla 8).

**Tabla 6. Actividad hemaglutinante de la lectina LsL**

Especie	Titulo de Hemaglutinación*	
	Nativos	Tratados con Sialidasa**
Humano A, B, O	8	NA
Caballo	16	NA
Rata	16	NA
Cerdo	32	NA
Pollo	64	NA
Ovino	128	2
Cuyo	512	4
Ratón	1024	8
Conejo	4096	2

\*Representa el inverso de la última dilución que presentó actividad aglutinante. \*\* Los eritrocitos se trataron con sialidasa de *V. cholerae* 45 min a 37°C. NA, actividad aglutinante ausente.

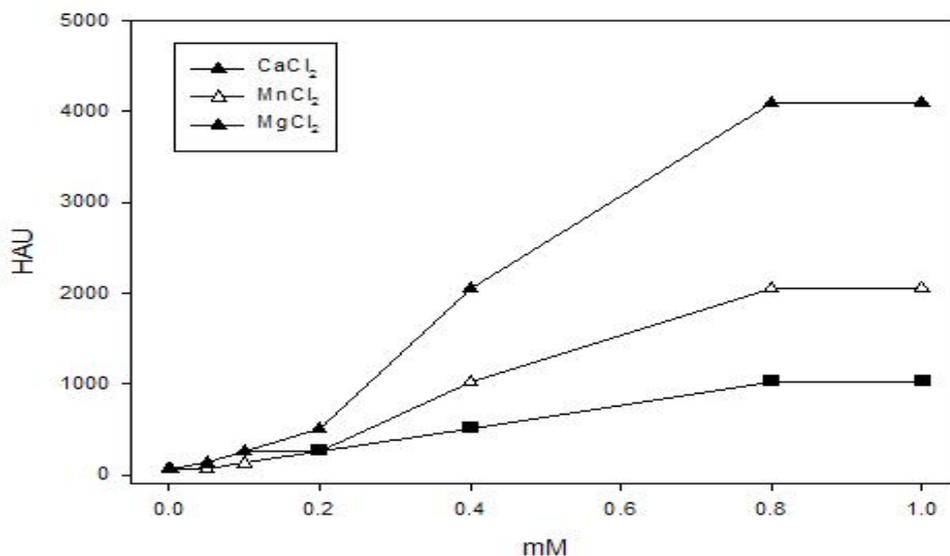
**Tabla 7.- Especificidad de LsL por carbohidratos y glicoproteínas.**

Inhibidor	Concentración (mM)*	Potencia Relativa inhibitoria**
Gal	50	1
GlcNH <sub>2</sub>	50	1
GalNAc	25	2
GlcNAc	12.5	9
NeuAc	3.1	16
FET	0.111	450.450
MSB	0.033	1515.15
IgA	0.003	16666.66

\* Concentración mínima para inhibir 4 UHA. \*\*Valor comparativo de la concentración de inhibidores/Gal. Otros azúcares/glicoproteínas sin actividad inhibitoria a 200 mM fueron Glc, Fuc, Ovo, sero y lactotransferrina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida y asialo-formas de mucina submaxilar bovina (MSB).

### **Efecto de cationes divalentes en la actividad aglutinante de LsL.**

El tratamiento de LsL con EDTA inhibió la actividad aglutinante de la lectina en presencia de eritrocitos de conejo o rata. La actividad aglutinante, sin embargo, se recuperó totalmente al añadir 1 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Con  $\text{MnCl}_2$  y  $\text{MgCl}_2$  a la misma concentración se restauró solamente 50 y 75 % de la actividad aglutinante de la lectina (LsL) tratada con EDTA (Figura 9).



**Figura 5. -Efecto de cationes en la actividad aglutinante de LsL.  $\text{CaCl}_2$  ( $\blacktriangle$ ),  $\text{MgCl}_2$  ( $\triangle$ ) o  $\text{MnCl}_2$  ( $\blacksquare$ ). La concentración inicial de proteína fue de 0.1 mg/ml; se utilizaron y se probaron con eritrocitos de conejo 2% en PBS.**

### **Estallido respiratorio**

Se determinó la producción de  $\text{O}_2$  a monocapas de hemocitos de *L. setiferus* por reducción de NBT, usando como activadores se utilizaron zymosan, y LsL. Monocapas con  $1 \times 10^5$  hemocitos se estimularon durante 30 minutos, con los diferentes activadores, la producción óptima de NBT<sub>r</sub> fue 17 nM; que se obtuvo con 2.3  $\mu\text{g/ml}$  de LsL (Tabla 9)

**Tabla 8.- Efecto de la lectina en la producción de NBT por hemocitos de *L. setiferus*.**

<b>Activador</b>	<b>Activación (%)</b>	<b>nMNBT</b>
Control	4.3	0.807±0.032
Zymosan (2mg/ml)	31.4	5.85±0.22*
LsL (2.3 µg/ml)	59.5	11.08±0.08*
LsL-Zymosan	92.7	17.25±1.1*
PMA-Zymosan	100	18.61±0.53*

*Hemocitos incubados con activadores 30 min antes de añadir NBT o NBT-Zymosan. Diferencias significativas a \*p<0.05 determinada por la prueba U de Mann-Whitney, comparada con el control (LsL+NBT) sin activador.*

### **Efecto de carbohidratos en la producción de radicales libres por la lectina.**

El efecto reductor del NBT mostrado por las células activadas con LsL disminuyó notablemente al probar el estallido respiratorio con los carbohidratos capaces de inducir inhibición de la hemaglutinación. El principal inhibidor fue el ácido siálico (437 nM) seguido de la galactosa (500 nM), y finalmente GalNAc (25.75 mM). Tabla 10.

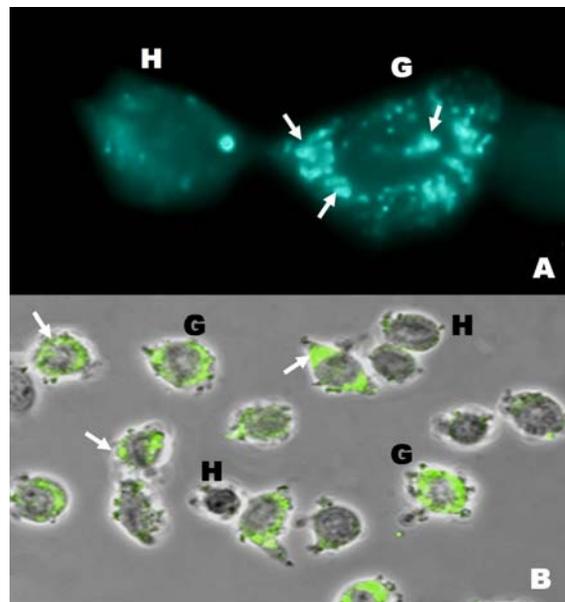
**Tabla 9.- Efecto de carbohidratos en la producción de radicales libres por la lectina.**

<b>Inhibidor</b>	<b>Inhibición %</b>	<b>nmoles NBT</b>
Control	0.0	16.6
GlcNAc	65	5.75*
GalNAc	47.2	9.48*
Neu5Ac	81.3	3.1*
Neu5Acα 2,3 lactosa	79.8*	3.5**
Neu5Ac α2,6 lactosa	81.9*	3.0**

*Los hemocitos fueron incubados con los carbohidratos a una concentración 100 mM, 10 min antes de añadir NBT-Zy. Gal, Man, Glc, Fuc. Se encontraron diferencias significativas con valores de \*p<0.05 y \*\*p<0.025 determinados por la prueba U de Mann-Whitney, comparado con el control (LsL+NBT) sin inhibidor.*

### **Identificación de hemocitos de camarón por LsL.**

El número de hemocitos promedio presentes en la hemolinfa de camarón *L. setiferus* fue de 300,000 +/- 2500 células/ml. Usando criterios morfológicos se encontraron tres principales categorías de hemocitos, previamente identificadas como hialinocitos, semigranulocitos y granulocitos. Utilizando la lectina marcada con biotina, se encontró que los 3 tipos celulares presentan receptores glicosilados (GlcNAc, GalNAc, NeuAc). Figura 10



**Figura 6. Microscopia de fluorescencia de hemocitos de *L. setiferus* marcados con LsL-Biotina y revelados con Avidina-FITC. A) Hemocitos suspendidos (las flechas indican el marcaje principalmente en gránulos) 100x, B.) Hemocitos adheridos (las flechas indican el marcaje principalmente en pseudópodos) 60 X. G. Hemocitos granulados, H. Hemocitos hialinos, 60X.**

### **Inmunoelectrotransferencia**

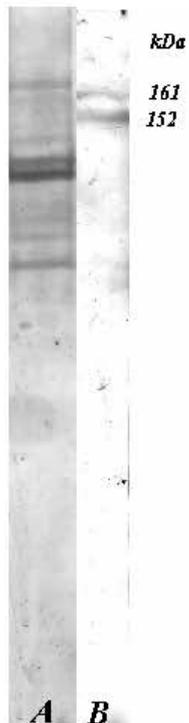
La electroforesis de la hemolinfa de *L. setiferus* y la lectina purificada LsL, transferidas a papel de nitrocelulosa, se revelaron con anticuerpos policlonales anti LsL. En la hemolinfa se reconocen 3 bandas de 85, 62 y 51 kDa la hemolinfa (Figura 11). En el ensayo control con Lectina purificada se confirma el reconocimiento de la subunidad de 85 kDa. Sugiriendo que esta subunidad es más inmunogénica que la subunidad de 61 kDa.



**Figura 7.- Inmunoelectrotransferencia de LsL revelada con anticuerpos policlonales anti-LsL.**

### ***Receptor celular para la Lectina LsL***

La caracterización del receptor celular para la lectina se realizó a partir de un lisado celular mediante la separación por electroforesis en condiciones desnaturizantes, el cual fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, y revelado con la lectina acoplada a peroxidasa. En el lisado celular se identifican varias fracciones teñidas con Coomassie (Figura 12), siendo las más relevantes las que se encuentran en un rango de pesos moleculares entre 162, 135, 130 y 95 kDa respectivamente, LsL-peroxidasa reconoce a las fracciones de 161 y 152 kDa (Figura 12).



**Figura 8.- Identificación del receptor en hemocitos de *L. setiferus* por electrotransferencia. Carril A) 50 µg/ml de hemocitos lisados, Carril B) Lisado de hemocitos revelado con lectina LsL-peroxidasa.**

### **Análisis bioinformáticos**

En el análisis realizado a las secuencias de los péptidos obtenidos, se encontró que LsL tiene una similitud de hasta 23% con el precursor de hemocianina en *L. vannamei* (pHcV) con punto isoeléctrico  $pI = 5.3$  y peso molecular de 74.96 kDa, ligeramente diferente a la subunidad de 85 kDa de LsL. La secuencia de péptidos similares a pHcV se alinean hasta con una homología del 95% con la porción que contiene cobre de la hemocianina de *L. vannamei* (HcV) en la región de aminoácidos 100 al 180. Así mismo, la secuencia de aminoácidos de algunos péptidos se alinean con una homología de hasta 85% con la región 59-170, que contiene un dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) en la HcV.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la porción amino terminal de 4 muestras diferentes de LsL determinadas por reacción de Edman, se encuentra para una secuencia consenso con homología de hasta 98%, demostrando que se

trata de una misma proteína, que presenta microheterogenidad, relacionado con algún factor no determinado por el momento. En los análisis realizados a la secuencia consenso se encontró una similitud del 75% con la misma porción amino terminal HcV en la secuencia 21 al 40. En el análisis de secuencias de péptidos internos, las secuencias resultantes fueron: RVAYGEDIGXNT y KGQGLEFDLVV, estas dos secuencias internas, analizadas mediante un BLAST (NCBI) no son significativamente parecidas a ninguna proteína reportada y secuenciada hasta el momento.

## Discusión

El estudio de la inmunidad en camarones decápodos se ha enfocado a la caracterización química de factores séricos y celulares involucrados en la respuesta inmune, con la intención de identificar los posibles mecanismos que los regulan y aportar elementos que pueden ser de aplicación diagnóstica o pronóstica en organismos que se encuentran expuestos a contaminación y/o procesos de alto riesgo de infección. En estudios recientes realizados en crustáceos decápodos se han identificado proteínas capaces de reconocer y atacar patógenos que invadan al organismo; estos estudios se han realizado en modelos genéticos donde a través de bases de datos de cDNA o mRNA descubren la sobre expresión de proteínas durante la respuesta inmune a virus patógenos en poblaciones de camarones en cultivo. Sin embargo, se ha puesto muy poco interés en conocer e identificar las diferentes vías de activación de estos mecanismos de defensa así como de las rutas bioquímicas desencadenadas durante la respuesta inmunitaria.

En el presente estudio se purificó y se realizó la caracterización química de una lectina de la hemolinfa del camarón *L. setiferus* de la lectina, también se realizaron algunos ensayos biológicos para tratar de identificar su posible papel biológico, se determinó la capacidad aglutinante en presencia de eritrocitos de diversas especies animales, así como su especificidad por carbohidratos y su efecto biológico en hemocitos circulantes.

La lectina del suero del camarón blanco del Golfo de México, *Litopenaeus setiferus* fue purificada por cromatografía de afinidad en estroma de eritrocitos de conejo. Mediante este procedimiento identificamos la lectina representa el 1.3%

del total de las proteínas presentes en el suero. En condiciones nativas LsL es una proteína oligomérica de 291 kDa formada por cuatro subunidades 2 de 80 y 2 de 52 kDa. Esta compuesta por 38.6% de aminoácidos hidrofóbicos, 28.4% polares y 18.9% cargados y no tiene carbohidratos unidos covalentemente. La secuencia amino terminal de la subunidad de 80 kDa presenta micro heterogeneidad. La secuencia consenso obtenida a partir de varias muestras es DAQN/HA/LHQKQHDVNFLHKKIYGDIGN, dos péptidos internos de la proteína se secuenciaron, estas son sus secuencias RVAYFGEDIXNT y KGNEQGLEFDLVN. Análisis de dicroísmo circular indican que LsL está compuesto principalmente por hojas  $\beta$ -plegadas en su estructura secundaria.

Se han reportado lectinas de varios pesos moleculares y tipos de organización en diferentes especies de camarones peneidos. La lectina del suero de *P. californensis* (BSH-1) es una proteína de 175 kDa, con subunidades de 41 kDa; la lectina de *P. monodon* pesa 420 kDa con subunidades de 27 kDa, mientras que *P. schmitti* presenta una lectina heterodimérica de 153 kDa con subunidades de 31 y 34 kDa. La lectina LsL es una lectina que se encuentra en el rango de masa molecular reportada para el género *Penaeus*. La lectina de *L. setiferus* (LsL) presenta una estructural diferente a las lectinas de camarón reportadas previamente. Así mismo, LsL es la primera lectina en peneidos de la cual se conoce la secuencia amino terminal y de la que mediante dicroísmo circular se dedujo su estructura secundaria.

En el análisis de la composición de aminoácidos de LsL, se identificó que los más abundantes son el ácido aspártico, ácido glutámico y leucina, en menor proporción están metionina y cisteína. La mayoría de los aminoácidos son no

polares lo que confiere a la proteína características hidrofóbicas confirmadas por el estudio de dicroísmo circular. Además una considerable porción de aminoácidos que generan estabilidad de la estructura en hojas betas plegadas (Tirosina, Isoleucina, Valina y Tirosina), lo que sugiere que se trata de una proteína fibrilar. Por su bajo contenido de cisteínas se puede suponer que LsL es una proteína que se disocia fácilmente al formar pocos puentes disulfuro.

El análisis por MALDI-TOF reveló 15 péptidos que corresponden a 209 aminoácidos y cuyas masas presentan hasta un 95% de similitud con la secuencia de la hemocianina y particularmente con la región que contiene cobre, la región comprendida entre el aminoácido 100 al 180. Esto sugiere que LsL pudiera tener su origen en la molécula de hemocianina (Hc) ampliando la gama de actividades que ha sido demostrada para esta molécula. Resulta por demás interesante el hecho de que LsL no presenta parecido con ninguna lectina purificada reportada hasta el momento proveniente de cualquier organismo pero si con la hemocianina, que es la proteína mas abundante en la hemolinfa de crustáceos.

Reportes recientes han demostrado que varias moléculas relacionadas con los mecanismos de defensa en los camarones podrían ser generados a partir de la hemocianina. Destomieux *et al.*, (2001) identificaron que algunos péptidos fúngicos que presentan un 90% de homología con la secuencia C-terminal de la Hc la cual se forma después de un estímulo antigénico. También Adachi y colaboradores (2002), han demostrado que algunos componentes de los hemocitos pueden convertir porciones de la hemocianina en una enzima parecida a la fenoloxidasa. En el pulpo *Octopus maya* y algunos artrópodos se ha demostrado que la hemocianina presenta actividades de oxido-reductasa (Zlateva

*et al.*, 1996) lo cual indica que efectivamente esta molécula puede tener varias funciones inmunológicas en diversos grupos de invertebrados marinos. Por otra parte, en el análisis de la secuencia de aminoácidos en el que se dedujo el gen de la peroxinectina se observó que existe homología entre esta molécula y el precursor de hemocianina (Sritunyalucksana and Söderhall, 2000). Estos datos parecen evidenciar que la hemocianina tiene importancia en la generación de efectores bioquímicos de inmunidad ante un estímulo antigénico. El estudio de la inmunidad en crustáceos, se ha basado en el estudio de moléculas que tienen la capacidad de activar y regular los mecanismos de defensa en el organismo, restándoles importancia a las moléculas que pueden actuar de forma paralela a estos mecanismos. La hemocianina es la principal proteína componente de la hemolinfa de Crustáceos, Miriápodos, Merostomados y Arácnidos, típicamente representa aproximadamente el 95% del total de proteínas presentes (Sellos *et al.*, 1997). La hemocianina en crustáceos es un hexámero con masa molecular de 450 kDa generalmente, en donde cada unidad monomérica contiene entre 600 y 660 aminoácidos con una masa molecular de 75-76 kDa (Stoeva *et al.*, 2001). Su principal función es la de transporte de oxígeno mediante la unión de este a átomos de cobre unidos a grupos prostéticos con contenido de histidina. Además de esta función como acarreador de oxígeno en muchos artrópodos, se ha sugerido que la hemocianina es una proteína multifuncional involucrada en procesos fisiológicos como la osmoregulación, almacén de proteínas, en actividades enzimáticas o como proteína con un rol importante en la respuesta inmune. En el caso de la tarántula *Eurypelmeta californicum*, la hidrólisis parcial *in vitro* de la hemocianina y el corte de secuencias N-terminales de la proteína

pueden activar actividad de fenoloxidasa (Decker and Rimke, 1998). En algunos reportes, algunos péptidos antibacterianos y antifúngicos en el camarón son generados a partir del grupo carboxilo terminal de la hemocianina. (Destoumieux-Garzon *et al.*, 2001; Destoumieux *et al.*, 1997). En otro reporte, se encontró que la hemocianina tiene actividad antiviral, afectando la replicación de los virus (Zhang *et al.*, 2004). En moluscos, existe una interesante relación entre hemocianina y lectinas, en el pulpo *Octopus maya* se reportó una lectina con especificidad hacia galactósidos con peso molecular muy similar al reportado para una unidad funcional de hemocianina en esta misma especie (Rogeneger *et al.*, 1985). La relación de hemocianina con los mecanismos de defensa en crustáceos requiere de un mayor estudio, en donde se pueda establecer no solo la relación existente, sino las rutas bioquímicas alternas a las conocidas que se desencadenan durante un evento de inmunidad.

Es posible que la lectina se genere por algún mecanismo de recombinación genética, con un proceso parecido al de biosíntesis de anticuerpos (cuyo repertorio es generado entre otros mecanismos por recombinación genética, y donde los dominios constantes de cada anticuerpo están compuestos principalmente de hojas beta plegadas), lo que podría explicar la presencia de péptidos internos de LsL con homología a regiones internas con contenido de cobre, y dominios Ig de la hemocianina. Se ha sugerido que el mecanismo de acción de las lectinas podría ser homólogo al de los anticuerpos en vertebrados, por su gran especificidad y por que pueden estar participando en la identificación, procesamiento y eliminación del antígeno. Aunque la lectina a diferencia de los anticuerpos nunca cambia de especificidad por los carbohidratos o por las

secuencias glicosídicas reconocidas. La hemolinfa y la lectina purificada de *L. setiferus* posee actividad aglutinante en presencia, principalmente de eritrocitos de conejo o rata, pero no de humano, caballo o cerdo. Los eritrocitos de conejo y rata poseen una importante concentración de derivados O-acetilados del ácido siálico (Neu5,9Ac) en la superficie (20-25% del total de residuos de ácido siálico) (Schauer *et al.*, 2004), el ácido siálico N-acetilado en el carbono 5 se encuentra principalmente en eritrocitos humanos y otro derivado del ácido siálico, con sustituciones de tipo N-glicolil se identifica en eritrocitos de cerdo, lo que sugiere que este determinante sacarídico juega un papel importante en la interacción de la lectina del camarón. La baja especificidad de la lectina por eritrocitos de caballo se explica por la presencia de derivados del ácido siálico O-acetilado en carbono 4 (Neu4Ac). La eliminación del ácido siálico de los eritrocitos por tratamiento enzimático con sialidasa, provocó una disminución importante en la actividad aglutinante, lo que confirma el papel relevante de este azúcar y su interacción con LsL.

En los ensayos de inhibición de la hemaglutinación con carbohidratos y glicoproteínas, encontramos que LsL reconoce principalmente galactosa, azúcar que también reconocido por las lectinas de *P. longirostris* y *Farfantepenaeus californensis* especies diferentes a *L. setiferus*, lo anterior podría significar una convergencia evolutiva en estas especies. La lectina en la hemolinfa podría tener funciones de reconocimiento de grupos O-acetilados, presentes en la superficie de bacterias patógenas a invertebrados como *Aeromonas sp* y *Bacillus cereus*. El reconocimiento hacia GlcNac sugiere que la lectina participa en el transporte de azúcares. La especificidad de la lectina (LsL) de la hemolinfa de camarones

durante estadios de muda y postmuda, se encuentra incrementada hacia GlcNAc (Datos no mostrados). La especificidad hacia sustituciones de 9-O-acetilsialico fue corroborado por ensayos de inhibición donde solamente glicoproteínas con estructuras O-glicosídicas ancladas fueron reconocidas por la Lectina, en ese mismo estudio, las glicoproteínas que tienen estructuras N-glicosídicas ancladas no fueron inhibitorias para la aglutinación. La hemaglutinación de LsL se inhibe por glicoproteínas y glicopéptidos de fetuina, por lo que concluimos que LsL reconoce estructuras O-glicosídica y de ácido siálico N-acetilado presentes en fetuina y mucina estomacal porcina.

Las lectinas identificadas en otros crustáceos decápodos como el langostino *M. rosenbergii*, *Cancer antenarius* y *Liocarcinus depurator*, muestran especificidad hacia ácido siálico y residuos O-acetil-siálico. Otros taxa en invertebrados, como la ostra *Crassostrea virginica* y el caracol *Mytilus edulis* tienen especificidad por GlcNAc; *Achatina fulica* y *Helix pomatia* son específicos por residuos O-acetilados y azúcares N-acetilados respectivamente, por lo que podemos suponer que la especificidad por azúcares N-acetilados sería una característica conservado en los invertebrados.

El tratamiento de la lectina con EDTA disminuyó notablemente la actividad aglutinante, mientras que la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa esta actividad, esto indica que este catión es esencial para la interacción lectina-azúcar formando puentes, entre ellos así mismo permite mantener la estructura terciaria de la Lectina, característica también compartida por la mayoría de las Lectina de camarones peneidos, con requerimientos similares de calcio. El calcio en las pruebas de especificidad es mejor inhibidor que  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , e indica que LsL es una lectina

cación-dependiente. Por el efecto inhibitorio de quelantes de cationes divalentes a la actividad de reconocimiento, la lectinas de camarones peneidos se han clasificado dentro del grupo de lectinas tipo C, familia de lectinas caracterizada por el requerimiento de calcio para su actividad.

Por estudios morfológicos de hemocitos circulantes de camarones se han identificado tres tipos celulares: Hialinos cuya principal es la fagocitosis; Semigranulares: que participan en la encapsulación, fagocitosis, y almacenamiento y liberación del sistema de la proFO, citotoxicidad; y Granulares: que almacenan y liberan el sistema de la proFO. En este trabajo se reporta la caracterización de estos tres tipos celulares circulantes. Cabe destacar que a diferencia de los hemocitos reportados en otros crustáceos, como el langostino *Macrobrachium rosenbergii*, los hialinocitos no presentan filiópodos o pseudópodos, y los tres tipos celulares se adhieren al vidrio. En un ensayo preliminar se realizó un cultivo primario de hemocitos de *L. setiferus*, en medio de cultivo RPMI con suero fetal bovino al 10%, los hialinocitos permanecieron viables durante 15 días, los granulocitos no se adhirieron a la superficie plástica de las botellas de cultivo, y fueron los primeros en desaparecer del cultivo.

Es notable que todos los hemocitos adherentes en *L. setiferus* tienen homólogos receptores para la lectina sérica. Algunos organismos presentan actividad de lectina que no se relaciona con la lectina en suero; por lo que podríamos suponer la presencia de otra lectina, posiblemente en membrana, capaz de reconocer componentes sacarídicos; con la misma especificidad que la lectina soluble. Esta lectina de membrana podría participar en fagocitosis reconociendo microorganismos activando el estallido respiratorio y destruyendo a los mismos,

así como secretando moléculas de adhesión y algún factor de proliferación celular. Para estudiar este interesante hecho, se realizaron estudios de activación del estallido respiratorio en monocapas de hemocitos.

La activación de el estallido respiratorio en hemocitos de *L. setiferus* fue inducido por inmuno estimulantes y por la lectina LsL. La activación del estallido respiratorio por la lectina resulta muy interesante ya que de forma muy evidente sugiere la presencia de receptores celulares específicos, y confirma la participación directa de esta proteína en la activación de los mecanismos defensa en el camarón. La producción de radicales  $O_2^-$  por hemocitos ya ha sido determinada en algunos invertebrados, como *Stroglyocentrotus nudus*, (Karlsson *et al.*, 2000), *Mytilus edulis* (Ito *et al.*, 1992), *Lymnaea stagnalis* (Pipe, R., 1992; Adema *et al.*, 1993) *Crassostrea virginica* (Anderson, *et al.*, 1992), así como en *Carcinus maenas* (Muñoz, *et al.*, 2000). En algunos decapados, se ha propuesto la participación de mecanismos específicos de reconocimiento de hemocitos a componentes sacarídicos de algunas cepas de bacterias patogénicas con la subsecuente activación del proceso oxidativo. En los camarones *L. vannamei* y *L. setiferus* se reportó la existencia y activación de este mecanismo oxidativo por algunos inmunoestimulantes como  $\beta$  glucanos, Ácido ascórbico, y LPS.

Con el propósito de demostrar la presencia de receptores para la lectina en membrana de hemocitos de camarones, durante la activación del estallido respiratorio se utilizaron diversos azúcares como inhibidores. Se determinó que el ácido siálico, la galactosa y GalNAc fueron los principales inhibidores, los mismos azúcares que inhiben la capacidad aglutinante de la lectina sérica LsL. La presencia de una lectina en la membrana de hemocitos con la misma especificidad

que la lectina sérica ya se ha reportada en invertebrados como en el langostino *M. rosenbergii* (Vázquez *et al.*, 1997), la jaiba azul *Callinectes sapidus* (Cassels *et al.*, 1986) o en la ostra *Crassostrea virginica* (Vasta *et al.*, 1984). En *M. rosenbergii* la presencia de la lectina de membrana que puede activar el estallido respiratorio por mecanismos diferentes que la lectina sérica, y considerando las grandes similitudes entre MrL y LsL suponemos que este mecanismo se encontrará en el camarón blanco del Golfo.

Con el propósito de caracterizar al receptor de la lectina sérica, se realizó una inmunoelectrotransferencia de un lisado celular de hemocitos, y posteriormente se reveló con la LsL-peroxidasa. En este estudio se identificaron dos fracciones de 161 y 152 kDa aproximadamente reconocidas por la lectina sérica. Lo que sugiere de manera importante que la lectinas sérica del camarón del golfo podría regula la actividad biológica de los hemocitos granulares y que participan en los mecanismos de defensa, activando la explosión oxidativa.

## Conclusiones

Se aisló y caracterizó una lectina sérica, clasificada del tipo C, del camarón blanco del Golfo de México, *Litopenaeus setiferus*.

- La determinación de la secuencia del amino terminal y la huella peptídica permiten identificar que la lectina posee similitud con Hemocianina.
- La lectina es una proteína con una estructura secundaria mayoritaria de hojas beta.
- La lectina tiene especificidad hacia carbohidratos N-acetilados.
- Esta lectina es capaz de activar la explosión oxidativa, mediante receptores específicos en hemocitos granulares.
- Nuestros datos sugieren que la lectina sérica de *L. setiferus* posee actividad reguladora de la explosión oxidativa en células con características fagocíticas.

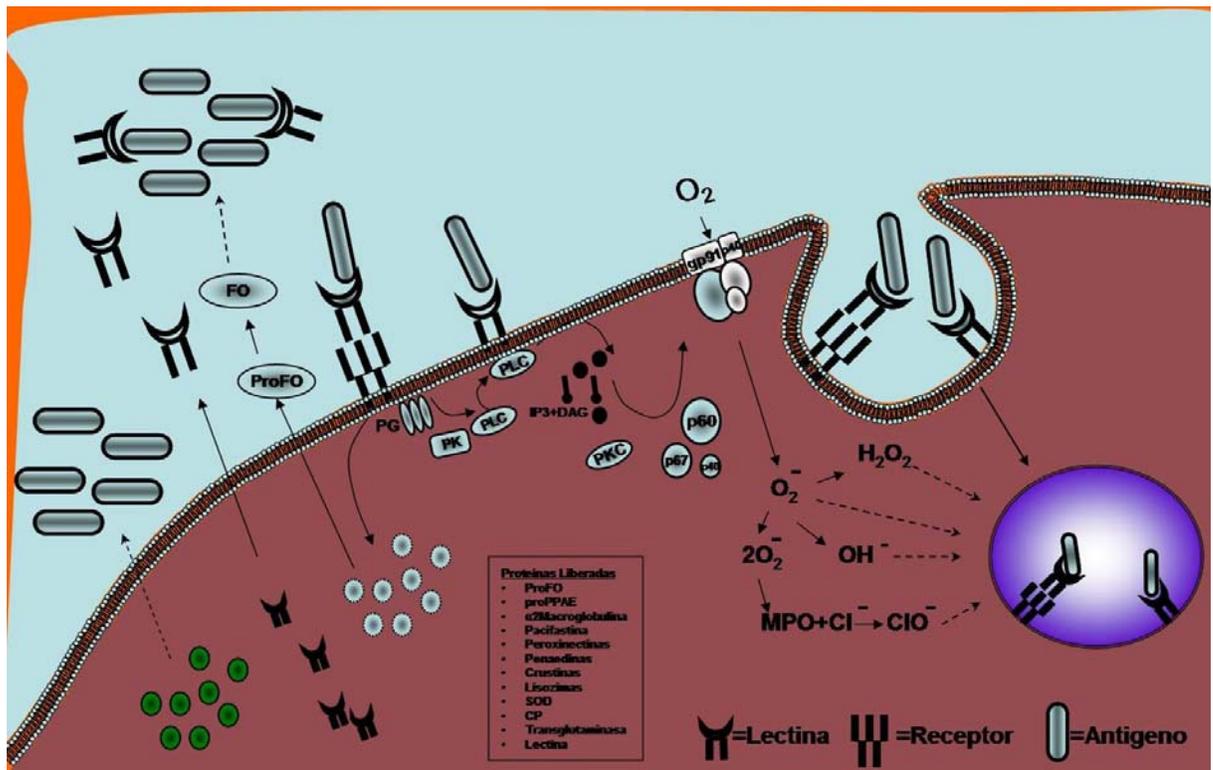


Figura 1.- Mecanismos de defensa conocidos en crustáceos.

## Perspectivas

La participación de la lectina en la explosión oxidativa es solamente una pista de la participación activa que podría tener en la inmunidad de estos organismos, por lo que es importante estudiar otras vías de activación de las células en las cuales participen lectinas, así mismo, es necesario terminar de caracterizar bioquímicamente el receptor de estas proteínas.

El parecido de la lectina con la hemocianina es una característica importante, por lo cual es necesario identificar el sitio de síntesis de la lectina por las células e identificar si la expresión de esta proteína está regulado por la presencia de elementos no-propios; será necesario para confirmar que la lectina posee una estructura relacionada a la hemocianina, además de lograr la secuencia completa de la proteína, ensayos de cristalización en presencia de carbohidratos N-acetilados y/o el receptor glicosilado para esta lectina.

## Referencias

Agundis, C., Pereyra, A., Zenteno, C., Brassart, C., Sierra, C., Vázquez, L., Zenteno, E. (2000) Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by ELISA. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 127:165-172.

Adachi, K., Hirata, T., Nishioka, T., Sakaguchi, M. (2002). Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 134: 135-141.

Adema, C. M., van Deutekom-Mulder, E. C., van der Knaap, W. P., Sminia, T. (1993). NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of gasteropod *Lymnaea stagnalis*. *J. Leukoc. Biol.* 54:379-383

Anderson, R. S., Oliver, L. M., Brubacher, L.L. (1992). Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction. *J. Inv. Path.* 59:303-307

Armstrong, P. B., Swarnakar, S., Srimal, S., Misquith, S., Hahn, E.A., Aimes, R.T., Quigley, J.P. (1996). A cytolytic function for a sialic acid-binding lectin that is a member of the pentraxin family of proteins. *J. Biol. Chem.* 271: 14717–14721.

Arreguin-Espinoza R., A., B., Hernández, A., Diupotex-Chong, M., Zenteno, E. (1997).  $\beta$ -galactose specific agglutinins in the molusk *Pomacea flagellata*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43: 1241-1251.

Bachere, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191: 3-11.

Bartlett, T. C., Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. *Mar. Biotechnol.* 4: 278-293.

Bayne, C. J. (1990). Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience* 40: 723-731.

Bing, J., Plum, P. (1937). Serum proteins in leucopenia. *Acta Medica Scandinavica* 92: 415-428.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bray, W.A., Lawrence, A.L., Leung-Trujillo, J.R., (1994). The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHHN virus and salinity. *Aquaculture* 122, 133-146.

Brock, J.A., Main, K.L., (1994). A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*., The World Aqua Soc, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Browdy, C.L., Stokes, A.D., Hopkins, J.S., Sdifer, P.A., (1991). Evaluation of intensive pond mono-and polyculture of *Penaeus setiferus* and *P. vannamei* in South Carolina. *Journal of the World Aquaculture Society* 22, 16-26.

Cominetti, M. R., Marques, M.R.f., Lorenzini, D.M., Lofgren, S.E., Daffre, S., Barracco, M.A. (2002). Characterization and partial purification of a lectin form the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schimitti*. *Dev. Comp. Immunol.* 26: 715-721.

Cuzon, G., Lawrence, A., Gaxiola, G., Rosas, C., Guillaume, J. (2004). Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235, 513-551.

Harvey, D. J., Jouffrey, C., Bulet, P., Bachere, E. (2001). Antifungal peptides are generated from the c terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J. Biol. Chem.* 276: 47070-47077.

Destoumieux, D., Muñoz, P., Bulet, P., Bachere, E. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1260-1271.

Ito T, Matsutani T, Mori K, Nombra T. (1992) Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Dev Comp Immunol*; 16:287–94.

Dubois, M.K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

Durliat, M. (1985). Clotting processes in crustacea decapoda. *Biol. Rev.* 4(60): 473- 498.

Fragdiakis, G. A., and Stratakis, E.K. (1995). Characterization of hemolymph lectins in the prawn *Parapenaeus longirostris*. *J of inv pathol* 65: 111-117.

Fragdiakis, G. A., and Stratakis, E.K. (1997). The lectin from the crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetylsalicylic acids. *Comp. Biochem. Physiol B* 117: 545-552.

King, J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., Sharon, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature* 285: 66.

Harvey, D.J. (2004). Electronic Outlook Report from the Economic Research Service. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767). Biol. Bull. 94, 244-262.

Ito T, Matsutani T, Mori K, Nombra T. (1992) Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. Dev Comp Immunol 16:287–94.

Johansson, M. W., Söderhäll, K. (1989). Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today 5: 171-176.

Karlsson, A., Nixon, J.B., McPhail, L.C. (2000) Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. J Leukoc Biol 67:396–404.

Kasai, K., Hirabayashi, J., (1996). Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. J. Biochem. 119: 1–8.

Kawabata, S. I., Mutua, T., Iwanaga, S. (1996). The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph the horseshoe crab. New directions in invertebrate immunology. K. Soderhall, Iwanaga, S., Vasta, G.R. Eds. Fair haven, SOS: 255-283.

King, J.E., (1948). A study of the reproductive organs of the common marine shrimp *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767). Biol. Bull. 94, 244-262.

Komano, K., Natori, S. (1985). Participation of *Sarcophaga peregrina* lectin in the lysis of sheep red blood cells injected into the abdominal cavity of larvae. Dev. Comp. Immunol. (9): 31–40.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Natura* 227: 680-685.

Le Moullac, G., Rodríguez, J. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109-11.

Le Moullac, G., Soyeux, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J., Levy, P., (1998). Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus*. *Fish and Shellfish Immunology* 8.

Lee, Y.K., Soh, B.S., Wu, J.H. (2001). Quantitative Assessment of Phagocytic Activity of Hemocytes in the Prawn, *Penaeus merguensis*, by Flow Cytometric Analysis. *Cytometry* 43: 82-85.

Lee, P.G., Lawrence, A., (1985). Effects of diet and size on growth, feed digestibility and digestive enzyme activities of the marine shrimp, *Penaeus setiferus* Linnaeus. *J. World Maricul. Soc.* 16, 275-287.

Lopez, N., Cuzon, G., Gaxiola, G., Taboada, G., Valenzuela, M., Pascual, C., Sanchez, A., Rosas, C. (2003). Physiological, nutritional, and immunological role of dietary B 1-3 glucan and ascorbic acid 2-monophosphate in *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquaculture* 62405: 1-21.

Lotz, J.M., Ogle, J.T., (1994). Reproductive performance of the white-legged shrimp (*Penaeus vannamei*) in recirculating seawater systems. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 477-482.

Marques, M.R.F., Barracco, M.A. (2000). Lectins, as non self recognition factor in crustaceans. *Aquaculture* 191: 23-44.

Pascual,C., Gaxiola,G., Rosas,C., (2003<sup>a</sup>). Blood metabolites d hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions d a comparison with other crustacean species. Marine Biology 142, 735-745.

McCumber, L. J., Hoffman, E.M., Clem, L.W. (1979). Recognition of viruses and xenogenic proteins by the blue crab, *Callinectes sapidus*. I. Clearance and organ distribution. J. Invert. Pathol. 33: 1-9.

Misamore, M.J., Browdy, C.L., (1996). Mating behavior in the white shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*: A generalized model for mating in *Penaeus*. J. Crust. Biol. 16: 61-70.

Mullainadhan, P., Renwranz, L. (1986). Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. Immunobiology. 171: 263-273.

Muñoz, M., Cedeño, R., Rodríguez, J., van der Knaap, W.P.W., Mialhe, E., Bachere, E. (2000) Measurement of reactive oxygen intermediate production in hemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 191:89–107.

Ni, Y., Tizard, I. (1996). Lectin–carbohydrate interaction in the immune system. Vet. Immunol. Immunopathol. 55:205–223.

Ogle, J.T., (1992). Variability in growth of postlarval *Penaeus vannamei*. Gulf Research Reports 8, 423-426.

Palacios, E., Pérez-rostro, C.I., Ramirez, J.L., Ibarra, A.M., Racotta, I.S., (1999). Reproductive exhaustion in shrimp (*Penaeus vannamei*) reflected in larval biochemical composition, survival and growth. Aquaculture 171, 309-321.

Pascual, C., Sanchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198: 13 –28.

Pascual, C., Gaxiola, G., Rosas, C., (2003<sup>a</sup>). Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Marine Biology* 142, 735-745.

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C., (2003b). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. *Aquaculture* 218, 637-650.

Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gaxiola, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E., Rosas, C., (2006). Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Press, Corrected Proof, Available online 10 August 2005*.

Rojas, E., Llinas, P., Rodríguez-Romero, A., Hernández, C., Zenteno, R., Vázquez, L., Martínez-Cairo, S., Rodríguez, A., Mendoza-Hernández, G., Zenteno, E., Agundis, C. (2004). Characterization of lectin aggregates in the hemolymph of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Biochim Biophys Acta* 1673 (3): 122-130.

Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J., Baum, L.G. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galactin-1. *Nature* 378: 736–739.

Persson, M., Soderhall, K. (1987). Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res.* (247): 409-303.

Peters, W., Kolb, H., Kolb-Bachofen, V. (1983). Evidence for a sugar receptor lectin in the peritrophic membrane of the blowfly larva *Calliphora erythrocephala* Mg Diptera. J. Insect Physiol. 29: 275–280.

Pipe, R.K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev Comp Immunol 16:111–22.

Ratanapo, S., Chulavatnatol, M. (1990). Monodin, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. **B**(97): 515–520.

Ratcliffe, N.A. (1989). The biological significance of immunity. Dev. Comp. Immunol. 13: 273-283.

Tyson, C. (1985). Purification and characterization of an O-acetylsalicylic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. J. Biol. Chem. 260: 8850-8856.

Renwantz, L. (1986). Lectins in mollusks and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. Symp. Zool. Soc. London 58: 81-93.

Rojas, E., Llinas, P., Rodríguez-Romero, A., Hernandez, C., Zenteno, E., Lascurain, R. (2001). Hevein, Allergenic lectin from rubber latex, activates neutrophils' oxidative burst. Glycocon J 18:339–45

Rook, G.A.W., Steele, J., Umar, S., Dockrell, H.M. (1985) A simple method for the solubilization of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by interferon. J Immunol Methods 82:161–7.

Sánchez, A., Pascual, C., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G., Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture* 198, 13-28.

Savage, D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G., Morgensen, S., Conklin, E., In: *Avidin-biotin chemistry: a handbook*. Rockford IL, USA: Pierce Chemical Co; 1992.

Smith, V. J., Söderhäll, K. (1983). Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell. Tissue. Res.* 233: 295-303.

Söderhäll, K., Smith, V.J. (1986). The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and roles in arthropod cellular immunity with special reference to crustaceans. *Immunity in invertebrates*. B. M. (ed). Berlin, Springer: 74-93.

Sritunyalucksana, K., Soderhall, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191: 53-69.

Tyson, C.J., Jenkin, C.R. (1974). Phagocytosis of bacteria in vitro by hemocytes from the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). *AJEBAK* 52: 341-348.

Vargas-Albores, F., Guzman-Murillo, M.A., Ochoa, J.L. (1993). A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* **A**(104): 407-413.

Vargas-Albores, F., Yepiz-Plascencia, G., (2000). Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. *Aquaculture* 191, 13-21.

Vasta, G.R., Cheng, T.C., Marchalonis, J.J. (1984) A Lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*) *Cell Immunol*; 88: 475-485.

Vasta, G.R. (1992). Invertebrate lectins: distribution, synthesis, molecular biology, and function. Glycoconjugates. H. J. Allen, K. Salas, E.C. Eds. New York, Marcel Dekker: pp. 593-634.

Vasta, G.R., Quesenberry, M., Ahmed, H., O'Leary, N. (1999). C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev. Comp. Immunol.* 23: 401–420.

Vázquez, L., Jaramillo, L., Lascurain, R., Cooper, E.L., Rosas, P., Zenteno, E. (1996). Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **B**(113): 355-359.

Vázquez, L., Maldonado, G., Agundis, C., Pérez, A., Cooper, E.L., Zenteno, E. (1997a). Participation of a sialic acid specific lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes, in the recognition of non-self cells. *J. Exp. Zoology.* 279: 265- 272.

Vazquez, L., Masso, F., Rosas, P., Montaña, L.F., Zenteno, E. (1993). Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* **B**(105): 617-623.

Vazquez, L., Perez, A., Millan, D., Agundis, C., Martin, G., Cooper, E. L., Lascurain, R. and Zenteno, E. (1997b). Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Morphol.* 234: 147–153.

Vázquez, L., Sierra, C., Juárez, S., Agundis, C., Zavala A., Zenteno E. (1998). Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia* **23**(6): 344-348.

## Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph

Juan Alpuche<sup>a,1</sup>, Ali Pereyra<sup>b</sup>, Concepción Agundis<sup>b</sup>, Carlos Rosas<sup>a</sup>, Cristina Pascual<sup>a</sup>, Marie-Christine Slomianny<sup>c</sup>, Lorena Vázquez<sup>d</sup>, Edgar Zenteno<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental, UMP, Facultad de Ciencias, UNAM. Sisal, Yucatán, C.P. 97130, México

<sup>b</sup>Departamento de Bioquímica, Laboratorio de Inmunología, Facultad de Medicina UNAM P.O. Box 70159, 04510 México

<sup>c</sup>Laboratoire de Chimie Biologique de la Université des Sciences et Technologies de Lille, UMR du CNRS n° 8576, Villeneuve d'Ascq, 59655 France

<sup>d</sup>Laboratorio de lectinas CIQ, Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, Morelos 60225 México

Received 16 November 2004; received in revised form 8 April 2005; accepted 15 April 2005

Available online 4 May 2005

### Abstract

A 291-kDa lectin (LsL) was purified from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus setiferus* by affinity chromatography on glutaraldehyde-fixed stroma from rabbit erythrocytes. LsL is a heterotetramer of two 80-kDa and two 52-kDa subunits, with no covalently-linked carbohydrate, and mainly composed by aspartic and glutamic acids, glycine and alanine, with relatively lower methionine and cysteine contents. Edman degradation indicated that the NH<sub>2</sub>-terminal of the 80-kDa subunit is composed DASNAQKQHDVNFL, whereas the NH<sub>2</sub>-terminal of the 52-kDa subunit is blocked. The peptide mass fingerprint of LsL was predicted from tryptic peptides from each subunit by MALDI-TOF, and revealed that each subunit showed 23 and 22%, respectively, homology with the hemocyanin precursor from *Litopenaeus vannamei*. Circular dichroism analysis revealed beta sheet and alpha helix contents of 52.7 and 6.1%, respectively. LsL agglutinates at higher titers guinea pig, murine, and rabbit erythrocytes its activity is divalent cation-dependent. N-acetylated sugars, such as GlcNAc, GalNAc, and NeuAc, were the most effective inhibitors of the LsL hemagglutinating activity. Sialylated O-glycosylated proteins, such as bovine submaxillary gland mucin, human IgA, and fetuin, showed stronger inhibitory activity than sialylated N-glycosylated proteins, such as human orosomucoid, IgG, transferrin, and lactoferrin. Desialylation of erythrocytes or inhibitory glycoproteins abolished their capacity to bind LsL, confirming the relevance of sialic acid in LsL–ligand interactions.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Lectins; Crustaceans; *Litopenaeus setiferus*; MALDI-TOF; Hemocyanin; Sialic acid; Specific lectin

### 1. Introduction

Invertebrates lack an adaptive immune system, but they have developed various defense mechanisms by which they recognize surface determinants on potential pathogens [1,2]. These mechanisms include hemolymph coagulation, cell agglutination, melanization, and phagocytic activity, production of reactive oxygen intermediates, and release of antimicrobial peptides [3,4]. Because of their specific

recognition of sugar determinants in the wall or the capsule of bacteria, lectins have been suggested to participate in innate immune response by inducing bacterial agglutination, or as opsonins, by enhancing phagocytosis rates of microorganisms by hemocytes [5,6]. A lectin of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda) recognizes N- and O-acetylated groups in carbohydrates of *Aeromonas* and *Bacillus cereus* [6]; similarly, the lectins from the Indian horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda* (Chelicerata: Xiphosura) [7,8], the silkworm, *Bombyx mori* (Insecta: Lepidoptera) [9,10], and the cockroach *Periplaneta americana* (Insecta: Blattodea) [11] bind complex oligosaccharides present in bacterial lipopolysaccharide (LPS).

\* Corresponding author. Fax: +52 (5) 616 24 19.

E-mail address: [ezenteno@servidor.unam.mx](mailto:ezenteno@servidor.unam.mx) (E. Zenteno).

<sup>1</sup> Student from the Graduate Studies Program at the Institute of Marine Sciences and Limnology, UNAM, Mexico.