



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE LA LECTINA SÉRICA CqL Y
SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNE CELULAR DE *Cherax quadricarinatus***

TESIS

~~ÁWWWÁ WÓÁJCÉ CÁ ÚVCE ÁJU ÚÁ ÓŠÖ ÜCÖU ÁÖÁ~~
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ LUIS SÁNCHEZ SALGADO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. CRISTINA PASCUAL JIMENEZ
UMDI-SISAL, UNAM
DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ
UMDI-SISAL, UNAM

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA
INSP

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**IDENTIFICACIÓN DEL RECEPTOR DE LA LECTINA SÉRICA CqL Y
SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA
INMUNE CELULAR DE *Cherax quadricarinatus***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
JOSÉ LUIS SÁNCHEZ SALGADO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. CRISTINA PASCUAL JIMENEZ
UMDI-SISAL, UNAM
DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ
UMDI-SISAL, UNAM
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM
DR. CUAUHTÉMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA
INSP

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2018

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 6 de Inmunología del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dra. Concepción Agundis Mata y Dr. Mohamed Alí Pereyra Morales, con el financiamiento del programa UNAM-PAPIIT (IN214315), beca CONACyT (376926); los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

Al Dr. Edgar Zenteno Galindo por darme la oportunidad de incorporarme en su equipo de trabajo, por ser un guía a través de este proyecto y el enorme apoyo que me ha brindado para mi formación académica.

A los miembros del comité académico: Dra. Cristina Pascual Jiménez, Dra. Leticia Arena Ortiz, Dr. Roberto Arreguin Espinoza de los Monteros y al Dr. Humberto Lanz Mendoza por enriquecer este proyecto con sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Concepción Agundis Mata y al Dr. Mohamed Alí Pereyra Morales por el desarrollo de este proyecto, así como la dedicación y paciencia en mi formación académica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi linda familia: Mi madre, mi padre, Cris, MaFer por ser un soporte esencial en mi desarrollo personal, gracias por apoyarme en todos los momentos que los he necesitado y por ser un ejemplo a seguir, gracias a todos Uds.

A mi nueva familia, Marlene: gracias por todo el apoyo que me has dado y sobre todo por alentarme a seguir cumpliendo mis metas... "Andábamos sin buscarnos pero sabiendo que andábamos para encontrarnos"

A la familia del Laboratorio: La Jefa, Alí, Joserra, Mont y Tania por ser excelentes amigos y compañeros en el laboratorio, hacer de cada uno de mis días único, aprender tantas cosas y aguantarme otras tantas.

A mis grandes amigos que me han acompañado a lo largo de mi vida, gracias por esas platicas interminables, por todas las palabras de ánimo y anhelo durante este proyecto.

PREFACIOS

La presente tesis está basada en los siguientes trabajos de investigación:

- **Sánchez-Salgado J. L.**, Pereyra M. A., Agundis C., Vivanco-Rojas O., Sierra-Castillo C., Alpuche-Osorno J. J., Zenteno E (2017). Participation of lectins in crustacean immune system. *Aqua Res.* 48: 4001 – 4011.
- Respuesta inmune en *Cherax quadricarinatus*: receptores en hemocitos. Pereyra Morales, Mohamed Alí; **Sánchez Salgado, José Luis**; Vivanco Rojas, Oscar; Agundis Mata, María Concepción (2017). *Mens. Bioquim.* 41: 49 – 53. ISSN: 0188 – 137X.
- **J.L. Sánchez-Salgado**, M.A. Pereyra, O. Vivanco-Rojas, C. Sierra-Castillo, J.J. Alpuche-Osorno, E. Zenteno, C. Agundis (2014). Characterization of a lectin from the crayfish *Cherax quadricarinatus* hemolymph and its effect on hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 39(2): 450–457. ISSN: 1050-4648.
- IV Congreso Latinoamericano de Glicobiología (2017). “The serum lectin of *Cherax quadricarinatus* binds to a granular hemocytes and participates in the ROS production through NADPH system and specific signaling molecules”
- XXXI Congreso Nacional de Bioquímica. (2016) “Participation of the humoral and cellular activity in hemolymph of crayfish *Cherax quadricarinatus* challenge with B-1,3 Glucans”.
- III Congreso Iberoamericano de Histología. (2016) “Regulación de CqL y su receptor mediante la estimulación con Zymosan A y LPS en el langostino *Cherax quadricarinatus*”.
- Tercer Congreso Latinoamericano de Glicobiología. (2015) “Regulation of CqLr expression on hemocytes of crayfish *Cherax quadricarinatus*”
- EMBO Workshop on Cell Biology of Animal Lectins. (2015) “Regulation of oxidative burst in hemocytes by a serum lectin of crayfish *C. quadricarinatus*.”
- XXI Congreso Nacional de Inmunología. (2014). “Identificación del homoreceptor de la lectina sérica en los hemocitos de *Cherax quadricarinatus*”.

INDICE

ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	13
RESUMEN	15
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	17
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	
Organismos	27
<i>Identificación y caracterización bioquímica del receptor de CqL en los hemocitos de C. quadricarinatus.</i>	
Poblaciones de hemocitos presentes en <i>C. quadricarinatus</i> .	27
Electroforesis SDS-PAGE Tricina.	28
Electroforesis Azul Nativa	28
Electroforesis en dos dimensiones.	29
Inmunoelectrotransferencia	30
Inmunofluorescencia.	30
<i>Activación in vitro de los hemocitos de C. quadricarinatus con diferentes estimulantes</i>	
Inmunofluorescencia en hemocitos estimulados.	31
Determinación de la generación de ROS en hemocitos.	32
<i>Activación in vivo de langosta de agua dulce C. quadricarinatus con diferentes estimulantes.</i>	

Reto antigénico de la langosta de agua dulce <i>C. quadricarinatus</i> .	33
Conteo total y diferencial de hemocitos.	33
Inmunofluorescencia	34
Actividad aglutinante de la lectina en el suero de <i>C. quadricarinatus</i>	34
Análisis estadístico.	34
RESULTADOS	
Identificación de poblaciones celulares en <i>Cherax quadricarinatus</i> .	35
Identificación y caracterización del receptor de CqL en los hemocitos	35
Producción de ROS en los hemocitos de <i>C. quadricarinatus</i> .	38
Identificación de proteínas fosforiladas en hemocitos activados con diferentes estimulantes.	39
Inhibición de la producción de ROS en hemocitos de <i>C. quadricarinatus</i> .	43
Identificación de CqLr en hemocitos activados con diferentes estimulantes.	44
Conteo total de hemocitos	46
Conteo diferencial de hemocitos	47
Identificación de CqLr en hemocitos obtenidos de organismos retados con diferentes estimulantes.	49
Actividad específica de la lectina en el suero de <i>C. quadricarinatus</i>	50
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	58
LITERATURA CITADA	59

ABREVIATURAS

AAS	Ácido Acetilsalicílico
CqL	Lectina de <i>C. quadricarinatus</i>
CqLr	Receptor de CqL
DPI	Diphenyleneiodonium
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil Galactosamina
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil Glucosamina
IAA	Iodoacetamida
JAK/STAT	Janus Cinasa / Transductores de Señal y Activadores de la Transcripción
Man	Manosa
MEK	Proteínas Cinasas Activadas por Mitogénico
NBT	Azul de Nitro-Tetrazolio
NeuAc	Ácido N-Acetilneuramínico
P38MAPK	p38 proteína Cinasa Activada por Mitogénico
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PMA	Forbol Miristato Acetato
PMSF	Fluoruro de Fenil metil sulfonilo
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
Ser	Serina
SYK	Tirosin Cinasa de Bazo (Spleen tyrosine kinase)
Thr	Treonina
TLR	Receptor de Tipo Toll
Tyr	Tirosina
WSSV	White Spot Syndrome Virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura 1. Identificación a nivel transcripcional de vías de señalización en hemocitos de crustáceos relacionadas con la respuesta inmune. Spz, Spatzle; MyD88, respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; TRAF6, Factor asociado a receptor 6; NFkB, Factor Nuclear kappa B; IMD, Deficiencia inmunitaria; STAT, señalizador transductor y activador de la transcripción, JAK; Janus cinasa (Modificado de Li y Xiang, 2013).

Figura 2. Poblaciones celulares de *Cherax quadricarinatus*. A) Hemocitos granulares B) Semi-granulares C) Hialinas. Barra = 10 µm.

Figura 3. Identificación de CqLr en el lisado de hemocitos. A) Lisado de hemocitos de *C. quadricarinatus* en condiciones desnaturalizantes (20 µg). B) Lisado celular revelado con CqL-B y estreptavidina-peroxidasa. Peso molecular = 120kDa. Marcadores de peso molecular: Precision plus proteins dual color standards (BioRad, USA).

Figura 4. Identificación de isoformas de CqLr mediante una electroforesis 2D. A) Lisado de hemocitos revelado con Azul de Comassie (80 µg). B) Lisado de hemocitos revelado con CqL acoplada a biotina y revelado con Estreptavidina-Peroxidasa. Marcadores de peso molecular: Precision plus proteins dual color standards (Bio-Rad, USA).

Figura 5. Identificación de CqL en condiciones nativas. A) Lisado total de hemocitos de *C. quadricarinatus* en condiciones nativas (50 µg). B) Lisado celular revelado con CqL-biotina y streptavidina-peroxidasa (490 KDa).

Figura 6. Identificación de CqLr en hemocitos granulares. A) Tipos de hemocitos de *C. quadricarinatus* en microscopía de luz; G = Hemocitos granulares, SG=

Hemocitos semigranuales y H= Hemocitos hialinos. B) Microscopía de luz de monocapa de hemocitos. C) Hemocitos granulares marcados con CqL-B. Barra = 20 μm .

Figura 7. Identificación de la fosforilación en residuos tirosina en hemocitos activados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BSM (2.5mM) a diferentes tiempos. Las células se revelaron con anticuerpo anti-tirosina fosforilada y se observaron en un microscopio con Epi- fluorescencia. 100x. La intensidad media fue estimada de la fluorescencia de Alexa594. Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos. Prueba ANOVA de dos vías. *** P <0.001, las condiciones fueron comparadas con el grupo CqL+BSM.

Figura 8. Identificación de la fosforilación en residuos treonina en hemocitos activados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BSM (2.5mM) a diferentes tiempos. Las células se revelaron con anticuerpo anti-treonina fosforilada y se observaron en un microscopio con Epi- fluorescencia. 100x. La intensidad media fue estimada de la fluorescencia de Alexa594. Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos. Prueba de ANOVA de dos vías. * P <0.05, *** P <0.001, las condiciones fueron comparadas con el grupo CqL+BSM.

Figura 9. Identificación de la fosforilación en residuos serina en hemocitos activados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BSM (2.5mM) a diferentes tiempos. Las células se revelaron con anticuerpo anti-serina fosforilada y se observaron en un microscopio con Epi- fluorescencia. 100x. La intensidad media fue estimada de la fluorescencia de Alexa594. Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos. Prueba de ANOVA de dos vías. * P <0.05, ** P <0.025, *** P <0.001; las condiciones fueron comparadas con el grupo CqL+BSM.

Figura 10. Detección de CqLr por inmunofluorescencia. A) Monocapa de hemocitos 1×10^5 incubados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y Control (Sin estímulo) por 60 minutos a 28°C. 63x. B) Hemocitos granulares bajo el estímulo de Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Barra = 20 μm . 100x.

Figura 11. Hemocitos totales en organismos retados con Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de dos vías. * $P < 0.05$, ** $P < 0.025$, *** $P < 0.001$. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

Figura 12. Células granulares en organismos retados con Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de dos vías. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

Figura 13. Células hialinas en langostas retadas con Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de dos vías. ** $P < 0.025$, *** $P < 0.001$. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

Figura 14. Conteo de células semigranulares en organismos retados con Zymosan A (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Solución Salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de una vía. No se observó variación en los valores comparados con el grupo control (SS) en cada tiempo.

Figura 15. Identificación de CqLr por inmunofluorescencia en una monocapa de hemocitos 1×10^5 extraídos de organismos retados con Zymosan A (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Solución Salina (SS) y No estimulado (Control) a diferentes tiempos e incubados a 28°C. A) Las células se revelaron con CqL- Biotina y estreptavidina-FITC y observaron en un microscopio con Epi-fluorescencia. 100x.

Figura 16. Actividad específica de la hemolinfa de organismos retados con diferentes estímulos: Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado

(Control). UHA = Inverso de la última dilución que mostró actividad de aglutinación.

Actividad específica = UHA/ mg de proteína. Prueba ANOVA de dos vías. * P <0.05;

*** P <0.001. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Producción de ROS por hemocitos de *C. quadricarinatus*

Tabla 2. Efecto de diferentes inhibidores de señalización en la producción de ROS por hemocitos estimulados con CqL.

RESUMEN

Los hemocitos en la hemolinfa de invertebrados realizan funciones de defensa contra patógenos, aún no se conocen con claridad los mecanismos celulares y humorales que participan en la regulación del sistema inmune en crustáceos. En la membrana de los hemocitos granulares de *Cherax quadricarinatus*, se identifica un receptor de la lectina sérica (CqLr) en el 34% de las células granulares, es una glicoproteína de 490kDa en su estructura nativa y está compuesta por subunidades de 120kDa que no presentan isoformas. Los hemocitos granulares estimulados con CqL (7.5 µg/mL) incrementan 360% la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) comparado con hemocitos no tratados, este efecto se inhibe con 200 mM Gal y de 100 mM NeuAc. En los hemocitos granulares se incrementa la fosforilación de proteínas intracelulares: 242% en residuos de tirosina, 192% en residuos de treonina y 152% en residuos de serina. Los inhibidores de SYK, PI3K, PKC, NADPH-Oxidasa, así como AAS y IAA, disminuyen significativamente la producción de ROS. Por otro lado, en hemocitos estimulados con β-glucanos (1 µg/mL) se observa un aumento en la presencia de CqLr en comparación con hemocitos estimados con LPS (0.1 µg/mL). En un modelo *in vivo*, se retaron organismos machos de 47.3 g ± 5.21 con β-glucanos (10 µg/mL) y LPS (1 µg/mL), se tomaron muestras a las 0, 2, 12, 24 h post-reto. En presencia de β-glucanos se observa un incremento en la presencia de CqLr en hemocitos granulares 2 horas después del reto. La capacidad aglutinante del suero muestra un incremento a 2 horas después del estímulo. Estos resultados sugieren que CqL podría participar en la activación de los hemocitos granulares y así participar en la respuesta inmune contra agente patógenos de la langosta *C. quadricarinatus*.

ABSTRACT

Hemocytes are in the invertebrate hemolymph, these cells perform defense functions against pathogens, however, it is not clear how cellular and humoral mechanisms participate in the regulation of immune system of crustaceans. It was identified a serum lectin receptor (CqLr) in the cellular membrane of the 34% granular hemocytes of *Cherax quadricarinatus*, it is a 490kDa glycoprotein and it is composed by 120kDa subunits without isoforms. Granular hemocytes stimulates with CqL (7.5 µg/mL) increase 360% production of reactive oxygen species (ROS) compared with unstimulated hemocytes, in the presence of CqL incubated with 200 mM Gal or 100 mM NeuAc, there was no significant difference in the ROS production. Granular hemocytes stimulated with CqL increase intracellular phosphorylation proteins: 242% tyrosine residues, 192% threonine residues, and 152% serine residues. SYK, PI3K, PKC, and NADPH-Oxidase inhibitors significantly decreases ROS production. On the other hand, Hemocytes stimulate with β-glucans (1 µg/mL) increase the CqLr presence compared with hemocytes stimulated with LPS (0.1 µg/mL). In *in vivo* model, male organisms (47.3 g ± 5.21) were treated with β-glucans (200 µg/kg) and LPS (20 µg/kg), samples were taken at 0, 2, 12, 24 h post-challenge. In presence of β-glucans, it was observed an increase of CqLr in granular hemocytes and the serum agglutination title 2 h post-challenge, in presence of LPS, it was not observed a significantly increase. These results suggest that CqL could participate in the activation of granular hemocytes and regulate the immune response against pathogens in the fresh water crayfish *C. quadricarinatus*.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Enfermedades en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*

En los últimos años, la langosta *Cherax quadricarinatus* se ha utilizado en la acuicultura a nivel global; sin embargo, se han reportado enfermedades en esta especie causadas por diferentes patógenos como: virus, bacterias y hongos que pueden afectar su desarrollo (Saoud *et al.*, 2013). Algunos de los virus que afectan a estos organismos pertenecen al tipo baciliformes intracelulares como el *virus baciliforme Cherax quadricarinatus* o *parvovirus de Cherax quadricarinatus de Bowater* de la familia *Parvoviridae* (Anderson y Prior, 1992; Bowater *et al.*, 2002). Las bacterias patógenas se encuentran frecuentemente en el medio de la langosta; los principales géneros que infectan a *C. quadricarinatus* son *Vibrio* y *Coxiella* (Edgerton *et al.*, 2002; Saoud *et al.*, 2013). Se han descrito algunas especies de hongos que pueden causar enfermedades como el género *Thelohania*, que afecta a esta especie en su hábitat natural (Herbet, 1987). Se ha reportado que el hongo del género *Vavraia* es patógeno para esta langosta, la infección causada por este patógeno ocasiona pérdida de movilidad del organismo (Langdon, 1991). A causa de las enfermedades causadas por estos agentes infecciosos, se han realizado avances para dilucidar los mecanismos inmunológicos celulares y humorales que participan en la eliminación de patógenos en los crustáceos (Longshaw, 2011).

La respuesta inmune en crustáceos

El sistema inmunológico de crustáceos está compuesto por una línea de defensa física conformada por el exoesqueleto (Tasumi y Vasta, 2007). Cuando los microorganismos logran introducirse en el organismo, el sistema inmune posee la capacidad de identificarlos mediante receptores solubles y/o por receptores

asociados a membranas celulares de reconocimiento a patrones (PRR) que identifican moléculas asociadas a patógenos (PAMP's) (Akira *et al.*, 2006). Este reconocimiento activa diferentes mecanismos humorales que colaboran en la eliminación de los patógenos como: el sistema de la profenoloxidasa (proFO), la coagulación, péptidos con actividad antimicrobiana y las lectinas (Tassanakajon *et al.*, 2013).

Existen mecanismos celulares que participan en el sistema inmunológico de los crustáceos; se han descrito tres poblaciones de células (hemocitos) con participación en la respuesta inmune: granulares, semi-granulares y hialinas; cada población posee características morfológicas particulares (Sun *et al.*, 2010). Estas células participan en diferentes procesos inmunológicos, entre los cuales destaca el proceso de encapsulación, mecanismo mediado por moléculas de adhesión que generan una unión entre hemocitos formando capas celulares alrededor de la partícula extraña para posteriormente eliminarlo (Smith, 2010). La fagocitosis es un mecanismo mediante el cual se internaliza el agente extraño y se elimina por mecanismos dependientes e independientes de oxígeno (Vázquez, *et al.*, 2009). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) que participan en la fagocitosis son producidas principalmente por la NADPH oxidasa (NOX) (Buchon *et al.*, 2014).

Las lectinas como receptores séricos específicos en la respuesta inmune

Se han reportado moléculas que participan en el reconocimiento hacia agentes patógenos en crustáceos, se han identificado 11 PRR's (Receptores de reconocimiento de patrones) entre los cuales destacan los receptores de tipo Scavenger, TLR's, lectinas tipo C y galectinas (Wang y Wang, 2013a). Estas

moléculas de reconocimiento identifican una amplia variedad de moléculas presentes en los patógenos como: lipopolisacáridos (LSP), peptidoglicanos (PGN), β -glucanos (Zymosan A) y ácidos nucleicos de origen viral (ARN/ADN), entre otros (Wang y Wang, 2013a). Dentro de los PRR's se encuentran las lectinas, estas moléculas son proteínas o glicoproteínas que reconocen carbohidratos con alta especificidad (Sharon, 2007). Se ha propuesto que las lectinas participan en la activación de los mecanismos de inmunidad presentes en los crustáceos (Sánchez-Salgado *et al.*, 2017).

Dentro de estos mecanismos, las lectinas participan en el proceso de la fagocitosis, la lectina MjGal del cangrejo *M. japonicus* y la lectina LvGal del camarón *L. vannamei* funciona como opsoninas que incrementan la capacidad fagocítica de los hemocitos (Shi *et al.*, 2014). Por otro lado, se han identificado que las lectinas participan en la activación de la explosión oxidativa de los hemocitos, estas moléculas colaboran en la eliminación del agente patógeno (Smith, 2010).

En el camarón *L. setiferus*, se identificó una lectina (LsL) con especificidad por azúcares N-acetilados, el receptor de esta lectina (LsLr) se localizó en el 85% de las células granulares, esta molécula está compuesta por dos subunidades de 61 y 52 KDa. Los hemocitos activados con LsL tienen un aumento del 60% en la producción de radicales libres de oxígeno en comparación con hemocitos no estimulados; se sugiere que el sistema de la NADPH oxidasa y otros mecanismos oxidativos participan en este mecanismo, cuando LsL se incubó con sus carbohidratos específicos, NeuAc, GalNAc y GlcNAc, se inhibió la producción de ROS, lo que indica que LsLr es una glicoproteína (Alpuche *et al.* 2009).

Los hemocitos del langostino *M. rosenbergii* producen 4.7 veces mayor cantidad de radicales libres del oxígeno en presencia de su lectina sérica (MrL) en comparación con hemocitos no estimulados, efecto que se inhibió con los azúcares específicos para esta lectina como GalNAc, GlcNAc y Neu5Ac (Sierra *et al.*, 2005). Los resultados sugieren que hay participación de un receptor glicosilado en la membrana de los hemocitos y que participa en la explosión oxidativa (Sierra *et al.*, 2005). En el camarón *M. japonicus*, la lectina (MjGal) aumenta significativamente la eliminación de agentes bacterianos. Se reportó la presencia del receptor en la membrana de los hemocitos, lo que podría indicar que la regulación de la respuesta inmune estaría relacionada con el reconocimiento de la lectina a través de su ligando glicosilado (Shi *et al.*, 2014).

La langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* posee una lectina sérica (CqL) formada por un heterotrímero de 290 KDa, CqL es dependiente de Ca^{2+} , presenta una amplia especificidad por carbohidratos, principalmente reconoce Gal y NeuAc (Sánchez-Salgado *et al.*, 2014). Esta lectina incrementa la producción de ROS en los hemocitos estimulados. Estos resultados sugieren que CqL participa activamente en la regulación de la producción de radicales libres (Sánchez-Salgado *et al.*, 2014).

La investigación sobre la caracterización de las lectinas, así como la identificación de su función en los mecanismos de defensa de los crustáceos ha aumentado considerablemente, sin embargo, aún no se conocen con claridad la señalización intracelular que se desencadena dentro de los hemocitos para activar los mecanismos inmunológicos (Wang y Wang., 2013b).

Vías de señalización de la respuesta inmune

Se han descrito 3 principales vías de señalización en el sistema inmune en invertebrados: Toll, Imd y JAK/STAT (Lemaitre y Hoffman, 2007). La activación de la vía de señalización Toll se induce principalmente por el reconocimiento de bacterias Gram positivas y hongos (Buchon *et al.*, 2014; Valanne *et al.*, 2011). La señalización Imd se desencadena en presencia de bacterias Gram negativas (Buchon *et al.*, 2014; Kleino y Silverman, 2014). Por último, la vía JAK/STAT se induce por el reconocimiento de citocinas, en recientes fechas, se ha observado que está asociada a una respuesta antiviral (Buchon *et al.*, 2014).

En los crustáceos se han descrito las mismas vías de señalización (Toll, Imd y JAK/STAT), sin embargo, la identificación se ha hecho a un nivel genómico. En el camarón *Penaeus monodon* se observa un aumento en la expresión a nivel transcripcional de una proteína homóloga a STAT posterior a la infección con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Chen *et al.*, 2008). En el camarón *F. chinensis*, se identificó y clonó una proteína homóloga a MyD88 (FcMyD88) que participa en la vía de activación de TLR en respuesta a infecciones bacterianas (Wen *et al.*, 2013). En *L. vannamei* se observaron proteínas relacionadas a Pelle, TRAF6 y Dorsal (Wang *et al.*, 2011).

Se ha sugerido que las lectinas séricas podrían activar estas vías de señalización. En *L. vannamei* se identificó una proteína similar a NFB que podría participar en la señalización mediante la activación de una lectina sérica (LvCTL4) (Li *et al.*, 2015). En *M. japonicus* se ha asociado el reconocimiento de bacterias por la lectina MjCC-CL y la activación de la vía de señalización JAK/STAT (Sun *et al.*, 2017)

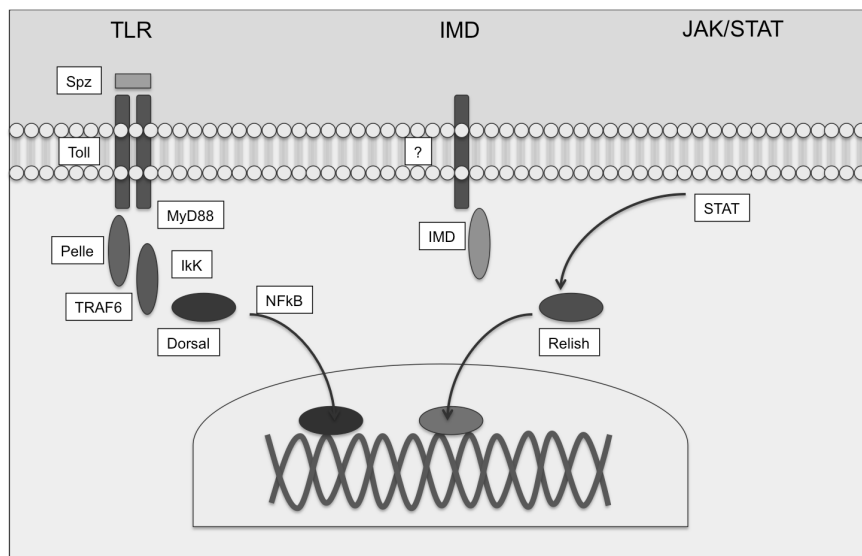


Figura 1. Identificación a nivel transcripcional de vías de señalización en hemocitos de crustáceos relacionadas con la respuesta inmune. Spz, Spatzle; MyD88, respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; TRAF6, Factor asociado a receptor 6; NFkB, Factor Nuclear kappa B; IMD, Deficiencia inmunitaria; STAT, señalizador transductor y activador de la transcripción, JAK; Janus cinasa (Modificado de Li y Xiang, 2013).

En otras especies de invertebrados, se determinó la participación de moléculas en las vías de activación de los mecanismos celulares responsables de la producción de ROS. En el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, se encontró que PKC y PI3K están involucrados en la producción de NOS en hemocitos (García-García *et al.*, 2008). En el caracol *Lymnaea stagnalis*, las PKC son proteínas relevantes en la señalización intracelular de hemocitos que producen ROS (Wright *et al.*, 2006). Los receptores que reconocen PAMP's y las moléculas que participan en las vías de señalización se han identificado a nivel transcripcional, es prioritario realizar análisis a nivel proteómico para tener un mejor conocimiento de las moléculas que participan en los mecanismos de defensa en crustáceos (Li y Xiang, 2013). Hasta el momento, se cuenta con poca información sobre los receptores específicos de

las lectinas y las vías de señalización en hemocitos, eventos de gran trascendencia en los mecanismos celulares que colaboran en la eliminación de agentes infecciosos.

JUSTIFICACIÓN

Existen reportes sobre enfermedades en crustáceos causadas por diferentes agentes infecciosos, se han descrito virus de la familia *Parvoviridae*; bacterias del genero *Vibrio* o *Coxiella* y hongos como responsables de múltiples enfermedades en *C. quadricarinatus*. En los últimos años, estos acontecimientos han causado importantes pérdidas económicas a nivel mundial.

Resultados previos sugieren la participación de una lectina sérica de *Cherax quadricarinatus* (CqL) en la activación de hemocitos para inducir la producción de radicales libres de oxígeno, mecanismo relacionado directamente con la fagocitosis que participa en la destrucción de agentes infecciosos. Hasta el momento, se cuenta con pocos estudios acerca de la presencia de receptores para estas lectinas en la membrana de los hemocitos y no se ha logrado determinar con claridad la presencia de vías de señalización en los hemocitos que generen la activación de la respuesta inmune celular mediada por la interacción de lectina y su ligando.

Por lo tanto, es importante realizar estudios acerca del reconocimiento de las lectinas séricas por sus receptores en la membrana de hemocitos y la activación intracelular que modula la respuesta inmune celular en crustáceos con el objetivo de aportar información sobre los mecanismos de inmunidad innata en respuesta a agentes patógenos.

HIPÓTESIS

La lectina sérica de *C. quadricarinatus* reconoce un receptor en los hemocitos que desencadena vías de señalización y activa el mecanismo de la explosión oxidativa.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la participación de la lectina como factor humoral en la activación de la respuesta inmune de los hemocitos en la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar y caracterizar el receptor de la lectina sérica (CqLr) en los hemocitos de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* en las diferentes poblaciones de hemocitos.
- Determinar la participación de CqL y su especificidad en la producción de ROS en los hemocitos de *C. quadricarinatus*.
- Identificar moléculas que participan en las vías de señalización de los hemocitos en presencia de CqL
- Analizar la presencia de CqLr en hemocitos y la capacidad aglutinante de la lectina en el suero de organismos estimulados con diferentes patrones moleculares asociados a patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismos.

Se utilizaron langostas de agua dulce adultos machos obtenidos del estanque “El Higuerón” ubicado en el municipio de Jojutla, Morelos. Los organismos se capturaron manualmente para evitar ser lesionarlos. El transporte de las langostas se llevó a cabo en hieleras conteniendo agua fría (10°C) y aireación constante. Se mantuvieron tres semanas antes de su manejo dentro del laboratorio, en peceras con aireación y temperatura constante de 28°C, fue suministrado alimento comercial (Purina, Suiza) tres veces por semana. La densidad de la población se mantuvo en 6 organismos por m². El estado de intermuda se determinó siguiendo la metodología descrita por Peebles, J. (1977). Se obtuvo el peso total de los organismos mediante el uso de una balanza Scott Pro (Ohaus, USA).

Identificación y caracterización del receptor de CqL en los hemocitos de C. quadricarinatus

Poblaciones de hemocitos presentes en *C. quadricarinatus*.

Se tomó una muestra de hemolinfa del seno pericardial, esterilizada previamente con alcohol etílico al 70%, con jeringa y aguja de 21g x 32mm, la muestra se diluyó 1:2 en anticoagulante para crustáceos (450 mM NaCl, 100mM glucosa, 30 mM Citrato de sodio, 26 mM Ácido cítrico, 20mM EDTA, pH=4.5). De cada organismo se extrajo 1 mL de hemolinfa; la muestra se colocó en tubos de plástico estériles a 4°C. Los hemocitos fueron lavados 3 veces en Solución modificada de Van-Harreveld (SS) (270 mM NaCl, 25.7 mM CaCl₂, 4.6 mM KCl, 2.6 mM MgCl₂, pH=8) (Lanz *et al.*, 1993) por centrifugación a 300 x g por 10 min a 4°C. El conteo diferencial

se realizó una cuenta de 100 células en 3 campos seleccionados aleatoriamente. Se determinó la viabilidad celular utilizando la tinción de azul tripán.

Electroforesis SDS-PAGE Tricina.

Los hemocitos previamente lavados, se incubaron por 30 min a 4°C con amortiguador de lisis (2 mM de Inhibidores de proteasas, Roche; 4mM PMSF; Tritón X-100 al 1% en amortiguador salino de fosfatos, PBS: NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄•H₂O 10mM, KH₂PO₄ 2mM; pH 7.3) en agitación constante. La suspensión resultante se centrifugó a 13,000 x g por 30 min a 4°C. El sobrenadante del lisado celular se corrió en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) en el sistema de SDS-PAGE-Tricina de Schägger (2006). Se emplearon estándares de peso molecular con rango de 10 a 250 KDa (Precision Plus Protein Dual Color, BioRad, USA). La electroforesis se corrió a 50V durante 30 min y posteriormente a 120V hasta finalizar el corrimiento.

Electroforesis Azul Nativa

Para determinar el peso molecular nativo de CqLr, se corrió la muestra en una electroforesis azul nativa (BN-PAGE) (Witting *et al.*, 2006). Después de lisar las células como se describió previamente, se incubó la muestra (150 µg) en 7 µL de amortiguador (50 mM Bis-Tris, 500 mM Ácido 6-aminocaproico, pH=7.0) y 3 µL of digitonina (50 mg/mL) a 4°C por 45 min. Después de la incubación, la muestra fue centrifugada 100,000 x g por 35 min. El sobrenadante fue colocado en un gel en gradiente lineal de poliacrilamida (4%-14%) of BN-PAGE, el gel corrió durante 18 h a 30V. El peso molecular de CqLr fue estimado utilizando como referencia complejos mitocondriales de bovino con un rango de 130kDa a 1500kDa (De los Rios-Castillo *et al.*, 2011).

Electroforesis en dos dimensiones.

Se prepararon las muestras (80 µg) utilizando solución de rehidratación (Urea 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, DTT 50mM, 0.5 % de IPG buffer pH 3-10; GE Healthcare, azul de bromofenol 0.002%) hasta obtener un volumen total de 125 µL. Las muestras se vertieron en los carriles de la bandeja de rehidratación (Amersham Biosciences, Suecia), a cada una muestra se le colocó una tira de poliacrilamida de 7 cm de longitud con rango de pH lineal de 3 a 10 (GE Healthcare, U.K.); las tiras, fueron cubiertas con 1mL de aceite mineral y se permitió la hidratación por 16h a temperatura ambiente. La separación por punto isoeléctrico (isoelectroenfoque) se llevó a cabo en la cámara Multiphor II (Amersham Biosciences, Suecia) con las siguientes condiciones: paso 1, 200 V por 20 min, con incremento de voltaje lineal; paso 2, 3,500 V por 2 h con voltaje lineal; paso 3, 3,500 V, 5,000 Vh, con un incremento de voltaje rápido, manteniendo como límite 50 µA por tira. Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron en 10 mL de amortiguador de equilibrio (Tris-base 50 mM pH 8.8; 6 M urea, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002 %) adicionado con DTT (64.8 mM) en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente; posteriormente las tiras fueron nuevamente incubadas en solución de equilibrio, esta vez adicionada con iodoacetamida (135 mM). La tira fue depositada en el carril correspondiente del gel separador, embebido en un gel de agarosa al 0.5 %; se preparó con acrilamida al 10 % en el sistema de SDS-PAGE-Tricina, en cámara de electroforesis vertical, en la parte superior, a un lado de la tira, se colocó el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad), La migración electroforética se llevó a cabo a 4°C con un voltaje constante de 120V por 90 minutos en la cámara SE260 Mighty Small II (Hoefer, USA)

Inmunoelectrotransferencia.

Posterior a las electroforesis, se incubó el gel en amortiguador de transferencia (Tris base 25mM, Glicina 192mM, Metanol 70%, pH=8.3) durante 90 min. La transferencia a membranas de Nitrocelulosa (Immobilon-P Membrane, Millipore), se realizó en un aparato Trans-Blot SD semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA) a temperatura ambiente con voltaje constante (25V) 60 min, las muestras transferidas a la membrana se visualizaron con tinción rojo de Ponceau (Sigma Chem., USA) (Towbin *et al.*, 1979). Los sitios reactivos libres se bloquearon con albumina sérica bovina libre de IgG al 0.25% (Sigma Chem., USA) en PBS y Tween 20 (PBS-T) al 0.1% durante 1 h. En seguida, las membranas se lavaron con PBS-T 3 veces, en agitación, 7 min cada lavado. Para detectar el receptor se adicionó CqL acoplada a biotina en dilución previamente establecida e incubó 16 h a 4°C. Se lavó la membrana con PBS-T 3 veces, 15 min cada lavado. Posteriormente, se adicionó estreptavidina-peroxidasa e incubó a durante 1 h a 37°C; al termino del tiempo, se lavó con PBS-T 4 veces y se procedió a la detección con Opti-4CN (BioRad, USA).

Inmunofluorescencia.

Los hemocitos se lavaron por centrifugación con SS a 300 x g a 4°C durante 10 min, después se colocaron en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-lisina y marcados con un lápiz hidrofóbico (Vector Labs, U.K.); se colocaron 1×10^5 células por pozo y se incubaron durante 15 min a 4°C en cámara húmeda, para posteriormente fijarse con paraformaldehido al 1% en PBS por 10 min, se bloquearon los pozos con albúmina sérica bovina libre de IgG (Sigma, USA) al 5% en PBS-T durante 30 min y las células se lavaron con SS. Para detectar el receptor, se adicionó CqL acoplada a biotina en dilución previamente establecida e incubó 2

h a 37°C, enseguida se lavó la muestra con PBS-T 4 veces. Se adicionó estreptavidina-FITC e incubó a 37°C durante 1 h. Al término, se lavó la muestra con PBS-T 4 veces y se montaron en anti-fotoblanqueador Vectashield (Vector Labs, U.K.). Se utilizó BSM como control. Los hemocitos marcados se observaron en un microscopio Leica DM/SL (Cambridge, U.K.) equipado con sistema de epi-iluminación.

Activación in vitro de los hemocitos de C. quadricarinatus con diferentes estimulantes

Inmunofluorescencia en hemocitos estimulados

Los hemocitos fueron obtenidos, lavados y montados en los portaobjetos como se describió previamente. Para detectar el receptor, se realizó una cinética de 60 minutos, al tiempo establecido en cada experimento, se fijaron los hemocitos con paraformaldehído al 1% en PBS durante 10 min, posteriormente, se lavaron las células con PBS-T 4 veces. Se adicionó CqL acoplada a biotina en dilución previamente establecida e incubó 2 h a 37°C, enseguida se lavó la muestra con PBS-T 4 veces. Se adicionó estreptavidina-FITC e incubó a 37°C durante 1 h. Para la detección de proteínas con tirosinas, treoninas y serinas fosforiladas, se utilizó el anticuerpo de ratón anti-treonina fosforilada, ratón anti-tirosina fosforilada o ratón anti-serina fosforilada en dilución de 1:100 e incubó 2 h a 37°C. A continuación, se colocó el anticuerpo anti-ratón acoplado a Alexa594 e incubó a 37°C durante 1 h. Al término de los dos procedimientos (CqL y anticuerpos), se lavó la muestra con PBS-T 4 veces y se montaron en anti-fotoblanqueador Vectashield (Vector Labs, U.K.). Se utilizó Gal como control de la activación mediante CqL, este carbohidrato es específico para la lectina. Los hemocitos marcados se observaron en un

microscopio Leica DM/SL (Cambridge, U.K.) equipado con sistema de epiluminación. La fluorescencia total de las células fue cuantificada por el conteo aleatorio de la fluorescencia media de 30 células granulares utilizando el programa ImageJ (Maryland, USA) por tiempo y estímulo evaluados.

Determinación de la generación de ROS en hemocitos.

Para la cuantificación del estallido respiratorio, se utilizaron monocapas de hemocitos en SS (1×10^5 células/pozo), las células se dejaron adherir en placas de 96 pozos con fondo plano (NUNC, Dinamarca) durante 15 minutos a 4°C. En el primer experimento, se colocaron CqL (7.5 µg/mL) solo o en presencia de las moléculas: Man, Glc, Gal y NeuAc, Mucina Submaxilar Bovina, (BSM), Fetuina, DPI (20 µM) y Superoxido dismutasa (SOD) (1 mU); los carbohidratos fueron utilizados a 200mM y las glicoproteínas a 1 mg/mL y fueron incubadas con CqL 20 min antes de añadirlos a los hemocitos.

En el segundo experimento se utilizó CqL (7.5 µg/mL) solo o en presencia de los inhibidores: inhibidor de MEK (PD98059, Cell Signal), inhibidor de NADPH-oxidasa (DPI, Sigma, USA), inhibidor de SYK (Piceatannol, Sigma, USA), inhibidor de PKC (Gö6983, Millipore), inhibidor de PI3K (LY294002, Millipore), inhibidor de P38MAPK (SB203580, Millipore), ácido acetilsalicílico (Sigma, USA), iodoacetamida (GE, U.K.), dexametasona (Sigma, USA), fluoruro de sodio (Sigma, USA) y azida de sodio (J.T. Baker, USA). Todos los inhibidores fueron añadidos 20 min antes de realizar el estímulo y posteriormente, se agregó CqL durante 30 min a 28°C.

A continuación, se incubaron con 100 µL de NBT al 0.2% (Sigma, USA) en Solución Salina al 0.85%, 30 min a 28°C. Al término del tiempo, las placas se lavaron con PBS y se fijaron con metanol al 70%; se añadió a cada pozo 120 µL de KOH 2 M y

se agitó durante una hora, en seguida se agregó 140 μL de dimetil sulfoxido (DMSO). La muestra se leyó a 630 nm en un lector de ELISA (Labsystems, Finlandia), con una solución de NBT como blanco. La reducción del NBT se reportó como nano moles de NBT reducido (nmol NBTr). Se realizaron 3 experimentos con 3 replicadas cada uno para llevar acabo el análisis estadístico.

Activación in vivo de langosta de agua dulce C. quadricarinatus con diferentes estimulantes.

Reto antigénico de la langosta de agua dulce C. quadricarinatus.

Para llevar acabo los retos antigénicos en un modelo *in vivo*, se utilizaron 6 organismos por cada condición: Lipopolisacáridos (LPS) (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), β 1,3-glucanos (Zymosan A) (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), SS (Solución Salina) y Control (Sólo toma de muestra); en cada organismo se administraron 100 μL con la cantidad indicada del estimulador. Posteriormente, se tomó una muestra de hemolinfa por una punción en el área del seno pericardial, esterilizada previamente con alcohol etílico al 70%, los tiempos de toma de muestra fueron 0 h, 2 h, 12 h y 24 h posteriores al reto antigénico. Cabe destacar que para cada condición se utilizó un organismo sin toma de muestra previa, esto con la finalidad de evitar pseudo-replicas.

Conteo total y diferencial de hemocitos.

Los hemocitos se lavaron por centrifugación con SS a 300 x g a 4°C durante 10 min, se resuspendieron en 1mL de la misma solución; se contaron las células en una cámara de Neubauer por triplicado. Para el conteo diferencial se colocaron 1×10^5 células por pozo y se incubaron durante 15 min a 4°C en cámara húmeda para posteriormente fijarse con paraformaldehido al 1% en PBS por 10 min. A

continuación, se contaron 100 células en 3 campos aleatoriamente en un microscopio Leica DM/SL de campo claro (Cambridge, U.K.).

Inmunofluorescencia.

Se utilizó la técnica descrita previamente. Brevemente, se colocaron 1×10^5 células por cada tiempo y reto antigénico que se evaluó, para detectar el receptor CqLr, se adicionó CqL acoplada a biotina y posteriormente se adicionó estreptavidina-FITC. Los hemocitos marcados se observaron en un microscopio Leica DM/SL (Cambridge, U.K.) equipado con sistema de epi-iluminación.

Actividad aglutinante de la lectina en el suero de *C. quadricarinatus*.

Se obtuvieron eritrocitos de conejos provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM, México. Se tomó la sangre en una solución estéril de Alsever (glucosa 100 mM, NaCl 20 mM y citrato sódico 30 mM, pH=7.3), los eritrocitos se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación (300 x g durante 10 min). La actividad hemaglutinante (UHA) del suero se realizó en placas U de microtitulación (NUNC, Dinamarca) por dilución seriada por triplicado. La cuantificación de la concentración de proteínas del suero se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976). La actividad específica se reportó como UHA/mg de proteínas de cada suero de los organismos por tiempo y estímulo evaluados.

Análisis estadístico.

Para la identificación de diferencias significativas en los muestreos realizados se utilizó el programa Stats 20 (IBM, USA), se realizó prueba de ANOVA de una vía o dos vías. La significancia estadística fue de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En este estudio se utilizaron organismos adultos machos en estado de intermuda. El peso promedio fue de $47.3 \text{ g} \pm 5.21$. Los organismos se mantuvieron en estanques con temperatura de $28 \text{ }^\circ\text{C}$ y concentración de oxígeno disuelto $>5 \text{ mg/L}$.

Identificación de poblaciones celulares en *Cherax quadricarinatus*.

El conteo diferencial de estas poblaciones fue: 62% células hialinas, 13% células semi-granulares y 25% células granulares (Fig. 2). El conteo total de hemocitos fue de 1.6×10^6 células por mL $\pm 0.14 \times 10^6$.

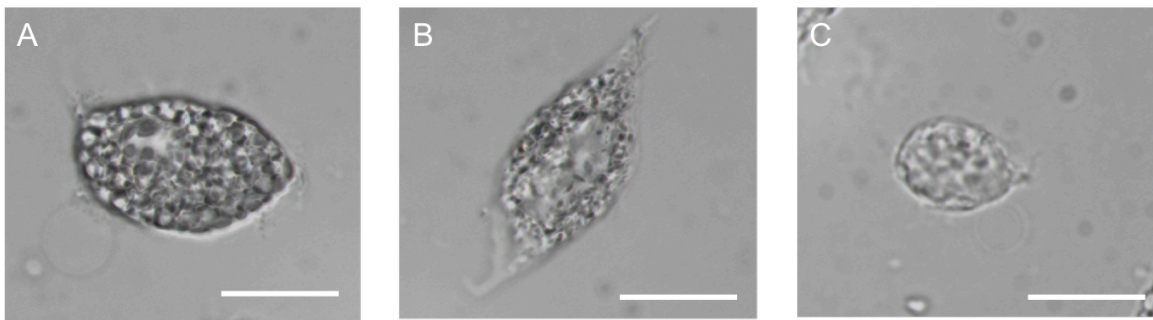


Figura 2. Poblaciones celulares de *Cherax quadricarinatus*. A) Hemocitos granulares B) Semi-granulares C) Hialinas. Barra = $10 \mu\text{m}$.

Identificación y caracterización del receptor de CqL en los hemocitos.

En el lisado celular de hemocitos de la langosta, se observó que el receptor está compuesto por una subunidad de 120 kDa en condiciones desnaturizantes (Fig. 3). Se observó que la subunidad que conforma al CqLr de 120 kDa , tiene un punto isoeléctrico (IP) fue de 7 y no presentó isoformas (Fig. 4).

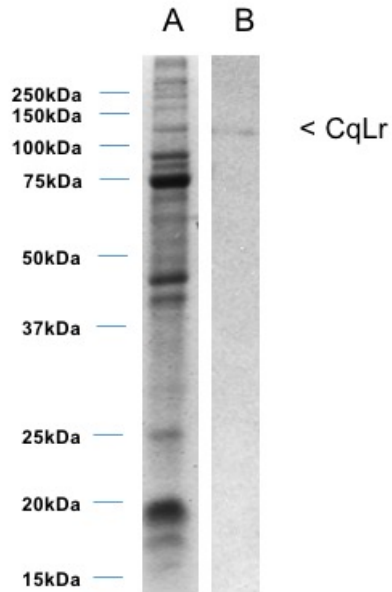


Figura 3. Identificación de CqLr en el lisado de hemocitos. A) Lisado de hemocitos de *C. quadricarinatus* en condiciones desnaturalizantes (20 μ g). B) Lisado celular revelado con CqL-B y estreptavidina-peroxidasa. Peso molecular = 120kDa. Marcadores de peso molecular: Precision plus proteins dual color standards (BioRad, USA).

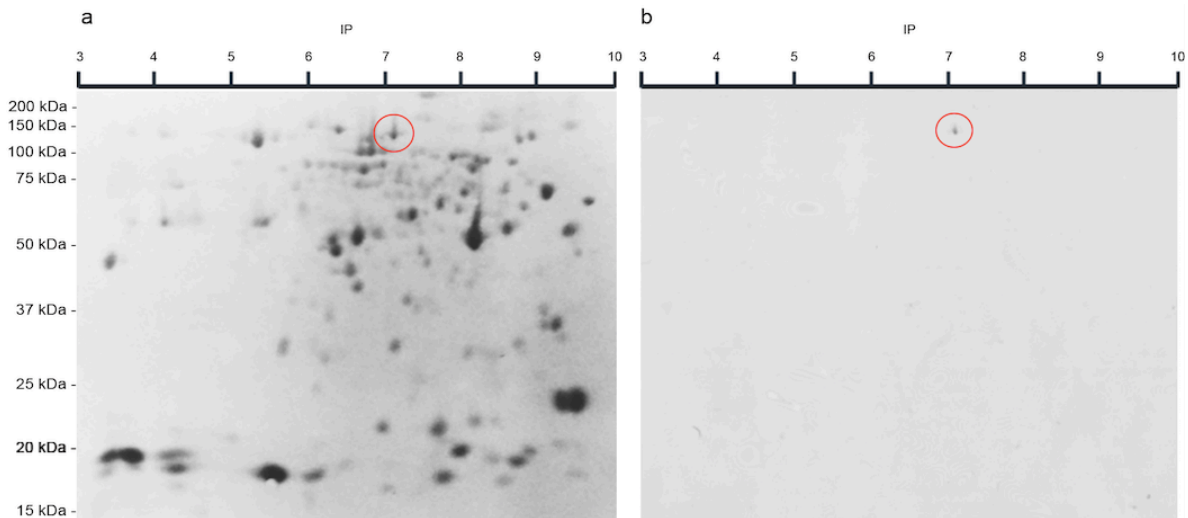


Figura 4. Identificación de isoformas de CqLr mediante una electroforesis 2D. A) Lisado de hemocitos revelado con Azul de Coomassie (80 μ g). B) Lisado de hemocitos revelado con CqL acoplada a biotina y revelado con Estreptavidina-Peroxidasa. Marcadores de peso molecular: Precision plus proteins dual color standards (Bio-Rad, USA).

La conformación nativa de CqLr presentó un peso molecular de 490 kDa (Fig. 5). Mediante una inmunofluorescencia, el receptor de la lectina CqL se observó en el 34% de los hemocitos granulares, es decir, esta molécula se localizó en el 8% de los hemocitos totales en circulación (Fig. 6).

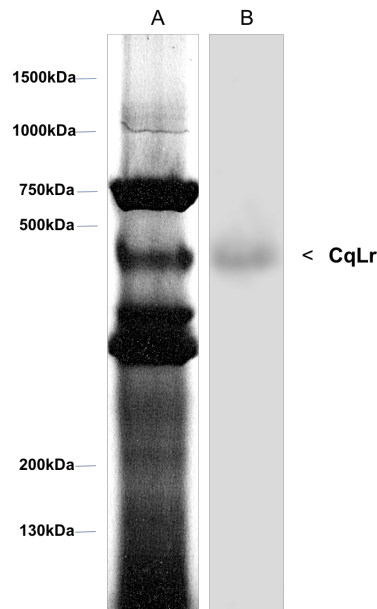


Figura 5. Identificación de CqL en condiciones nativas. A) Lisado total de hemocitos de *C. quadricarinatus* en condiciones nativas (50 μ g). B) Lisado celular revelado con CqL-biotina y streptavidina-peroxidasa (490 kDa).

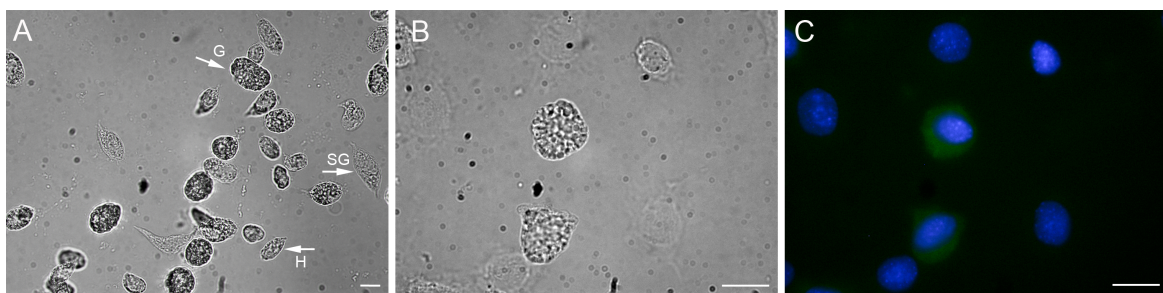


Figura 6. Identificación de CqLr en hemocitos granulares. A) Tipos de hemocitos de *C. quadricarinatus* en microscopía de luz; G = Hemocitos granulares, SG= Hemocitos semigranuales y H= Hemocitos hialinos. B) Microscopía de luz de monocapa de hemocitos. C) Hemocitos granulares marcados con CqL-B. Barra = 20 μ m.

Activación in vitro de los hemocitos de *C. quadricarinatus* con diferentes estimulantes.

Producción de ROS en los hemocitos de *C. quadricarinatus*.

Se determinó la participación de CqL en la activación de la explosión oxidativa usando la prueba de reducción de NBT (NBTr) (Tabla 1). La concentración óptima de CqL para producir NBTr fue de 7.5 µg/mL. CqL y PMA aumentaron la generación de ROS en un 300% y 327% respectivamente en comparación con los hemocitos no tratados. La especificidad de CqL sobre los hemocitos se evaluó incubando la lectina durante 30 min con diferentes carbohidratos antes de estimular a los hemocitos.

Tabla 1. Producción de ROS por hemocitos de *C. quadricarinatus*

Estimulador	Concentración	nMNBTr (nmol)
Sin Estímulo	-	1.1
PMA	7.5 ng	4.7**
CqL	7.5 µg/mL	4.5**
CqL/Man	200 mM	4.4**
CqL/Fet	0.05 mM	3.2*
CqL/Glc	200 mM	2.9*
CqL/Gal	200 mM	2.8*
CqL/NeuAc	100 mM	2.6*
CqL/SOD	1 mU	1.9
CqL/DPI	20 µM	1.5

Hemocitos incubados por 60 min con: Forbol 12-miristato-13 acetato (PMA), Superóxido dismutasa (SOD), difenileniodonio (DPI), Fetuina (Fet). Prueba de t-student, * P<0.05, **P<0.025 los grupos fueron comparados con el grupo control.

Los principales carbohidratos que inhibieron la actividad de CqL fueron: Gal y NeuAc, 51% y 55% respectivamente; la Man no mostró ningún efecto. El superóxido dismutasa (SOD) inhibió 72% y el Difeniliodonio (DPI) 89% de la reducción de NBT en hemocitos activados con CqL (Tabla 1).

Identificación de proteínas fosforiladas en hemocitos activados con diferentes estimulantes.

Por inmunofluorescencia, se identificó en los hemocitos la presencia de proteínas fosforiladas (Tyr, Thr y Ser) posteriores a los estímulos. En la identificación de Tyr-P (Fig. 7), el grupo estimulado con Zymosan A mostró a los 5 min un aumento del 380% en comparación al grupo sin estímulo; a los 15 min y 30 min, no hubo diferencias significativas. El estímulo de CqL tuvo un incremento del marcaje a los 5 min de 242%; los tiempos posteriores al estímulo no presentaron cambios significativos. El grupo CqL+BSM y sin estímulo no se presentó variaciones a ningún tiempo de activación evaluado.

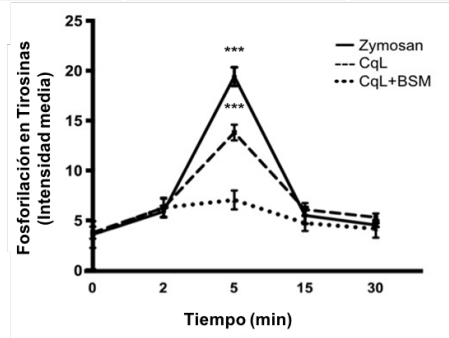
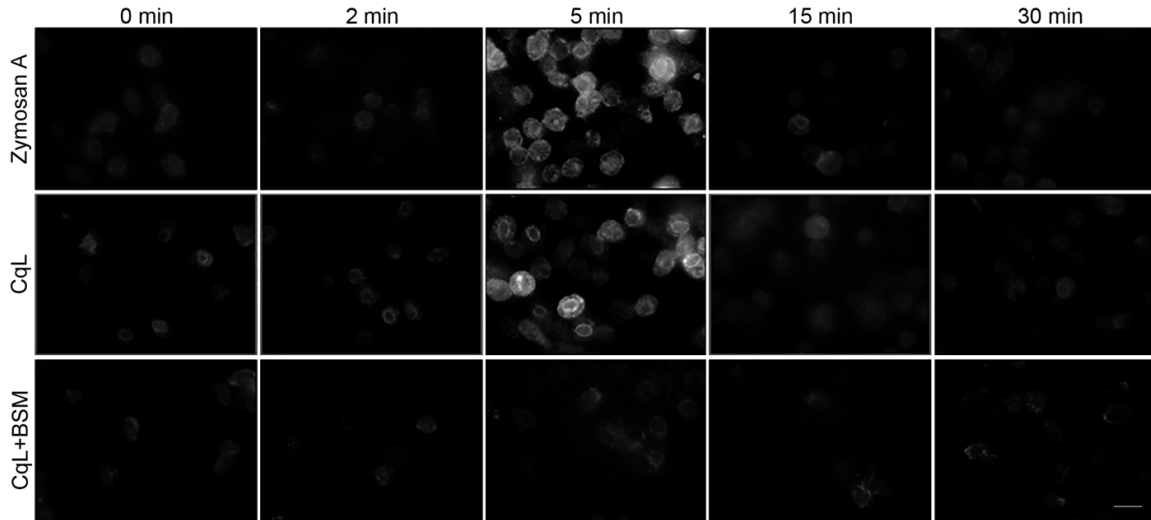


Figura 7. Identificación de la fosforilación en residuos tirosina en hemocitos activados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BSM (2.5mM) a diferentes tiempos. Las células se revelaron con anticuerpo anti-tirosina fosforilada y se observaron en un microscopio con Epi- fluorescencia. 100x. La intensidad media fue estimada de la fluorescencia de Alexa594. Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos. Prueba ANOVA de dos vías. *** P <0.001, las condiciones fueron comparadas con el grupo CqL+BSM.

En presencia de Zymosan A, se observó un incremento en la fosforilación de Thr a partir de los 2 min; a los 5 min se identificó un aumento del 184% con respecto al grupo sin estímulo (Fig. 8). Tras 15 y 30 min, no se observaron valores diferentes en la presencia de proteínas fosforiladas en Thr. Con el estímulo de CqL, a los 5

min se observó un incremento de 192% superior con respecto a los valores mostrado por el grupo sin estímulo. Al transcurrir 15 y 30 min, los valores son similares a los reportados en el grupo sin estímulo al mismo tiempo, es importante mencionar que con la activación de CqL se observó marcaje solo en células granulares. Las células que se incubaron con CqL+BSM y el grupo sin estímulo, no mostraron un aumento significativo en el marcaje a ningún tiempo bajo las mismas condiciones a las que se mantuvieron los todos grupos.

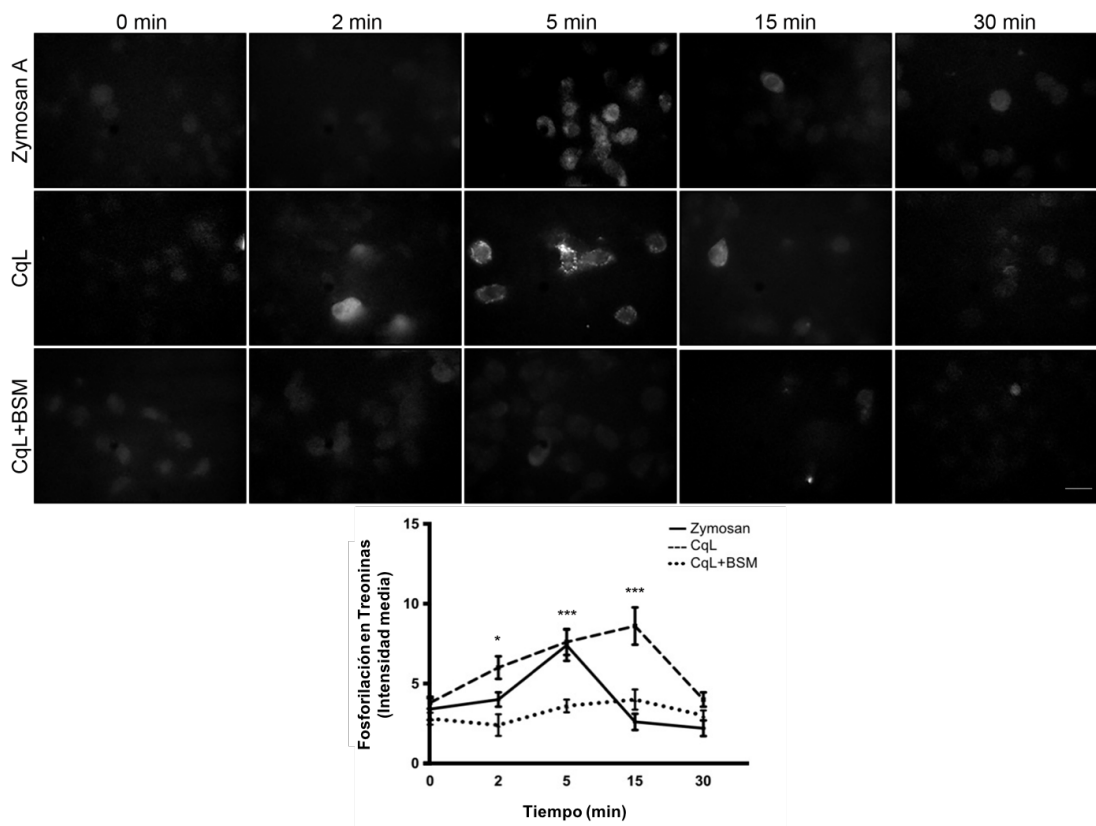


Figura 8. Identificación de la fosforilación en residuos treonina en hemocitos activados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BSM (2.5mM) a diferentes tiempos. Las células se revelaron con anticuerpo anti-treonina fosforilada y se observaron en un microscopio con Epi- fluorescencia. 100x. La intensidad media fue estimada de la fluorescencia de Alexa594. Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos. Prueba de ANOVA de dos vías. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, las condiciones fueron comparadas con el grupo CqL+BSM.

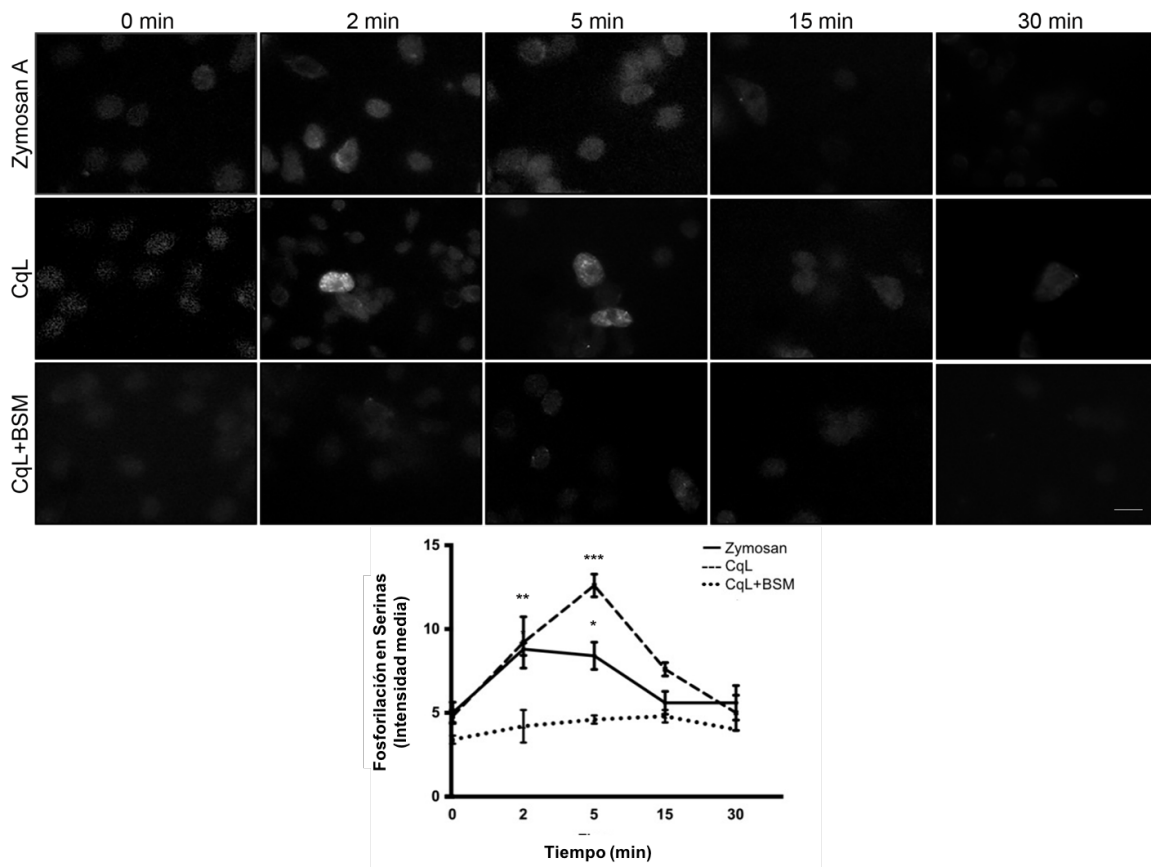


Figura 9. Identificación de la fosforilación en residuos serina en hemocitos activados con Zymosan A (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CqL (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y BSM (2.5mM) a diferentes tiempos. Las células se revelaron con anticuerpo anti-serina fosforilada y se observaron en un microscopio con Epi- fluorescencia. 100x. La intensidad media fue estimada de la fluorescencia de Alexa594. Los datos son el promedio \pm SEM de tres experimentos. Prueba de ANOVA de dos vías. * P < 0.05, ** P < 0.025, *** P < 0.001; las condiciones fueron comparadas con el grupo CqL+BSM.

Por último, se identificó la fosforilación de proteínas en el residuo de serina (Fig. 9). En las células estimuladas con Zymosan A hubo un aumento en el marcaje del 131% y 100% al transcurrir 2 y 5 min respectivamente. El estímulo de CqL a los 2 min, provocó aumento del marcaje de 142% en comparación con el grupo sin

estímulo; a los 5 min, se identificó el valor más alto 152% de la fosforilación de Ser; a los 15 min y a los 30 min no se observó diferencia con el grupo sin estímulo. En la inhibición de la actividad de CqL+BSM, no se identificó aumento en la presencia de serinas fosforiladas.

Inhibición de la producción de ROS en hemocitos de *C. quadricarinatus*.

Para determinar la participación de algunas moléculas en las vías de activación al interior de los hemocitos se utilizaron inhibidores específicos. Las dos moléculas que presentaron una mayor disminución en la producción de ROS fueron el ácido acetilsalicílico (AAS) y el inhibidor de PKC (Gö6983), el decremento fue del 63% y 61% respectivamente (Tabla 2). Otras moléculas con una disminución significativa con respecto al grupo estimulado con CqL fueron: el inhibidor de PI3K (LY294002) que inhibió 50%; el inhibidor de SYK (Piceatannol) redujo la formación de ROS 51%; por último, la iodoacetamida (IAA) generó una disminución del 48% con respecto a la activación con CqL. En cambio, en presencia de los inhibidores de proteínas MEK (PD98059), P38MAPK (SB203580), Dexametasona, Fluoruro de Sodio y Azida de sodio, no se observó una disminución significativa en la producción de ROS (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de diferentes inhibidores de señalización en la producción de ROS por hemocitos estimulados con CqL.

Estimulador	Concentración	nMNBTr (nmol)
Sin Estímulo	-	1.1***
Zymosan A	1 µg/mL	8.7***
CqL	7.5 µg/mL	4.8
CqL/MSB	2.5 mM	1.7***
CqL/AAS	2.5 mM	2.5***
CqL/ Gö6983	1 µM	2.6***
CqL/ Piceatannol	50 µM	3.0**
CqL/ LY294002	50 µM	3.0**
CqL/IAA	50 mM	3.1**

Hemocitos incubados por 60 min con: Mucina submaxilar bovina (MSB), Ácido acetilsalicílico (AAS), inhibidor de PKC (Gö6983), inhibidor de SYK (Piceatannol), inhibidor de PI3K (LY294002), yodoacetamida (IAA). Prueba de ANOVA de una vía. **P<0.025, ***P<0.001. los grupos fueron comparados con el grupo CqL.

Identificación de CqLr en hemocitos activados con diferentes estimulantes.

Los hemocitos se estimularon con diferentes estimulantes a diferentes tiempos, se identificó la presencia de CqLr (Fig.10A). A 60 min, se observó un aumento del en la presencia del receptor de CqL en los hemocitos granulares estimulados con Zymosan A con respecto al grupo sin estímulo (Fig. 10B); al estimular hemocitos con LPS, no se observaron modificaciones en la presencia de CqLr en los hemocitos en ningún tiempo evaluado.

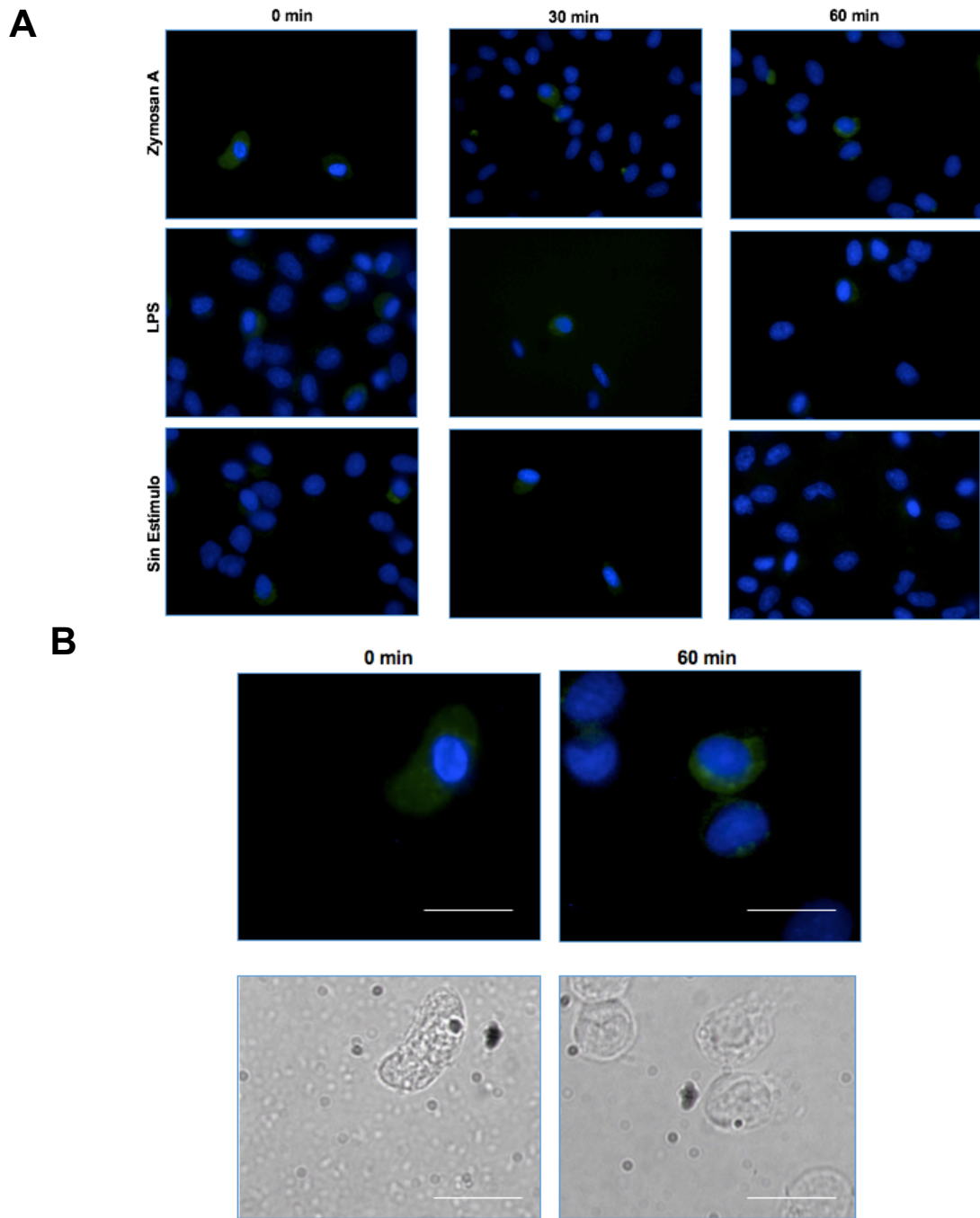


Figura 10. Detección de CqLr por inmunofluorescencia. A) Monocapa de hemocitos 1×10^5 incubados con Zymosan A ($1 \mu\text{g/mL}$), LPS ($1 \mu\text{g/mL}$), CqL ($7.5 \mu\text{g/mL}$) y Control (Sin estímulo) por 60 minutos a 28°C . 63x. B) Hemocitos granulares bajo el estímulo de Zymosan A ($1 \mu\text{g/mL}$). Barra = $20 \mu\text{m}$. 100x.

Activación in vivo de los hemocitos de *C. quadricarinatus* con diferentes estimulantes

Conteo total de hemocitos

El conteo total de células por mL de hemolinfa se realizó a las 0, 2, 12, 24 h después de llevar a cabo el reto con LPS y Zymosan A. El número de hemocitos circulantes a las 0 h (Conteo total de hemocitos) en la langosta fue de 1.6×10^6 células/mL $\pm 0.14 \times 10^6$ (n = 16). La estimulación con LPS presentó un incremento del 91% con respecto al control; a las 12 h, el conteo disminuyó 75% en comparación con el grupo control (Fig. 11). En la estimulación con Zymosan A, los hemocitos totales se incrementaron 116% a las 2 h con respecto al control y a las 12 h tuvieron un decremento del 50% menor al control. 24 h posteriores a la estimulación, los valores de LPS y Zymosan A, no presentaron diferencias significativas en relación al grupo control (Fig. 11).

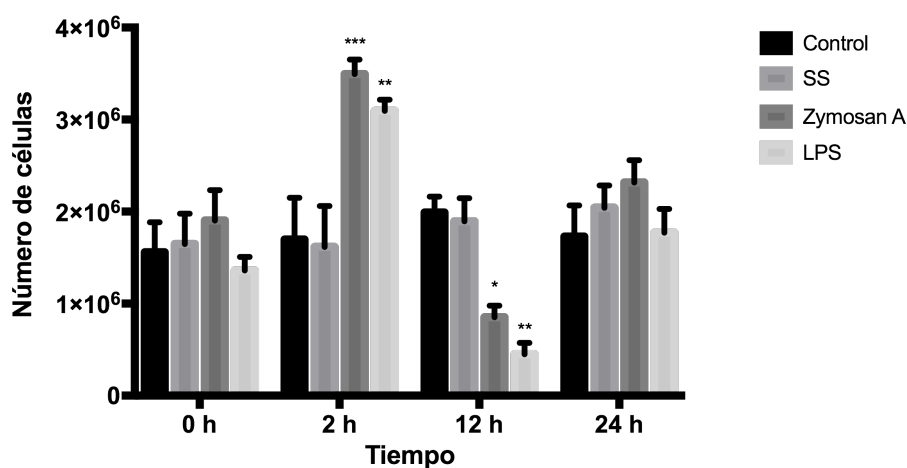


Figura 11. Hemocitos totales en organismos retados con Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de dos vías. * P < 0.05, ** P < 0.025, *** P < 0.001. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

Conteo diferencial de hemocitos

Las células granulares variaron con el estímulo de Zymosan A disminuyendo 50% a las 2 h con respecto al grupo SS; después de 12 h, los valores fueron similares al grupo SS (Fig. 12). Tras el estímulo de LPS a las 2 h disminuyó 41% las células granulares en comparación con el grupo SS al mismo tiempo; después de 12 h, la cantidad de células aumentó hasta alcanzar los valores del grupo control.

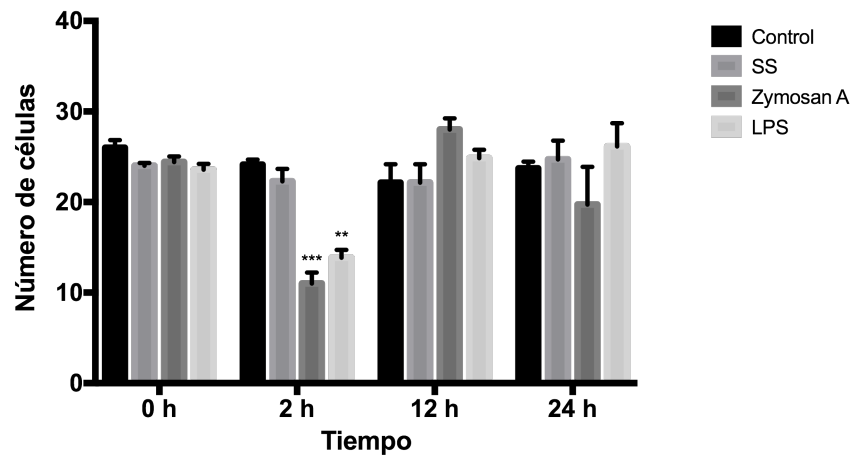


Figura 12. Células granulares en organismos retados con Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de dos vías. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

En las células hialinas tras el estímulo de Zymosan A, se registró un aumento del 20% con respecto al grupo SS a las 2 h, a las 12 h disminuyó la presencia de estas células hasta igualar los valores del grupo SS. El reto con LPS generó incremento del 17% comparado con el grupo SS; a las 12 y 24 h no se encontró incremento significativo (Fig 13).

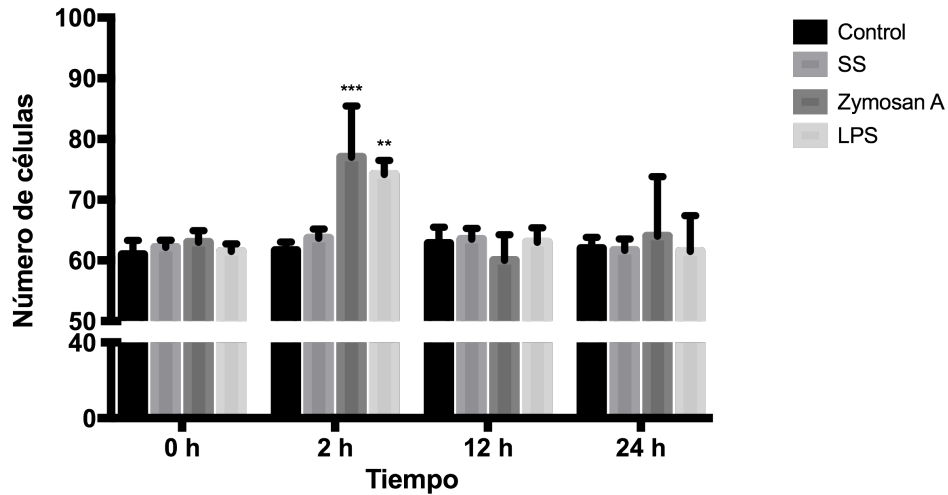


Figura 13. Células hialinas en langostas retadas con Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de dos vías. ** $P < 0.025$, *** $P < 0.001$. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

En las células semigranulares no se observaron cambios significativos en la cantidad de células cuantificadas en los diferentes grupos muestreados (Fig. 14).

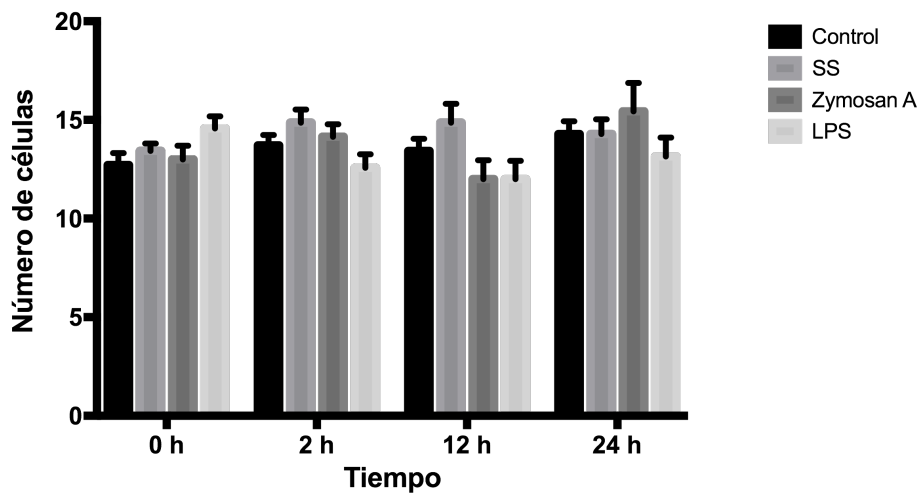


Figura 14. Conteo de células semigranulares en organismos retados con Zymosan A (200 µg/kg), LPS (20 µg/kg), Solución Salina (SS) y No estimulado (Control). Prueba ANOVA de una vía. No se observó variación en los valores comparados con el grupo control (SS) en cada tiempo.

Identificación de CqLr en hemocitos obtenidos de organismos retados con diferentes estimulantes.

Se realizó una inmunofluorescencia con hemocitos de los organismos retados para determinar variaciones en la presencia de CqLr. Hay un incremento del 754% en las células granulares de los organismos retados con Zymosan A 2 h post-estímulo (Fig 15).

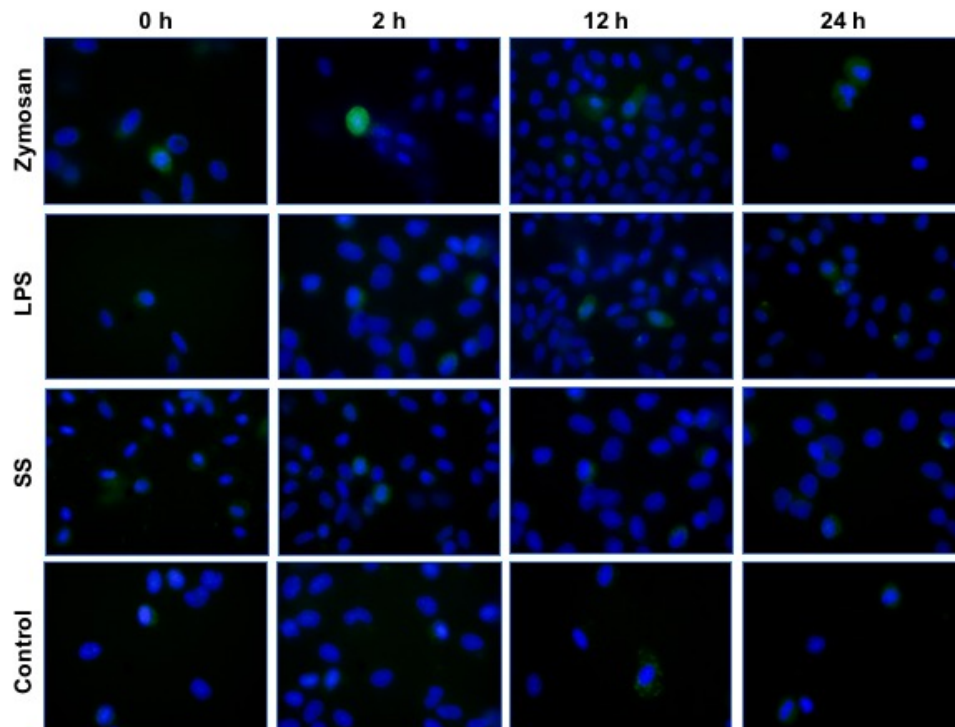


Figura 15. Identificación de CqLr por inmunofluorescencia en una monocapa de hemocitos 1×10^5 extraídos de organismos retados con Zymosan A (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$), LPS (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Solución Salina (SS) y No estimulado (Control) a diferentes tiempos e incubados a 28°C. A) Las células se revelaron con CqL- Biotina y estreptavidina-FITC y observaron en un microscopio con Epi-fluorescencia. 100x.

A las 12 y 24 h no se observó un incremento en la presencia del receptor. Es importante mencionar que el marcaje no aumentó en el número de células granulares ni en otra población celular. En los otros grupos (LPS, SS y Control), no

se observó variación en la presencia de CqLr después del reto a ningún tiempo muestreado (Fig. 15).

Actividad específica de la lectina en el suero de *C. quadricarinatus*

Se determinó la actividad específica presente en el suero de *C. quadricarinatus*, se registró incremento de la actividad específica en el grupo de Zymosan A a 2 h y 12 h del 250% y 178% respectivamente comparados con el grupo SS. 24 h posteriores al reto, se obtuvieron datos sin diferencia significativa entre los cuatro grupos muestreados (Fig. 16).

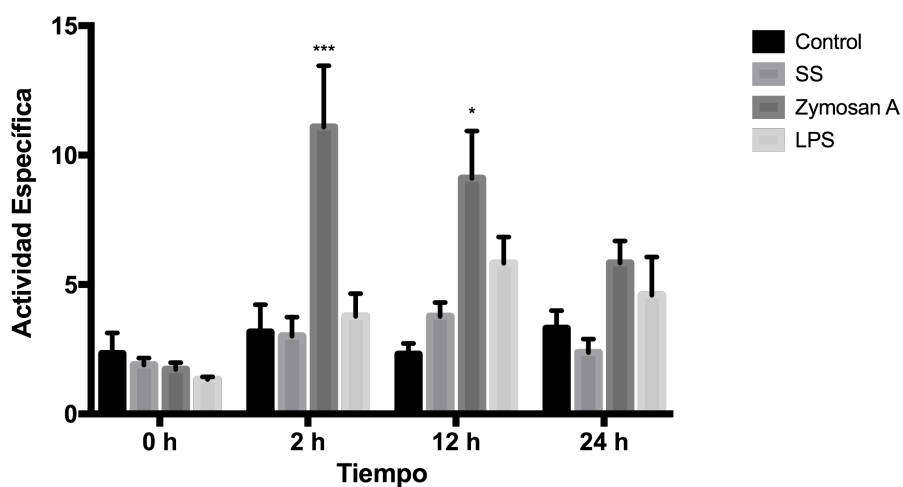


Figura 16. Actividad específica de la hemolinfa de organismos retados con diferentes estímulos: Zymosan A, LPS, solución salina (SS) y No estimulado (Control). UHA = Inverso de la última dilución que mostró actividad de aglutinación. Actividad específica = UHA/ mg de proteína. Prueba ANOVA de dos vías. * P <0.05; *** P <0.001. Los valores se compararon con el grupo SS en cada tiempo.

DISCUSIÓN

El sistema inmune está constituido por varias poblaciones de células y moléculas que, de forma coordinada, generan una respuesta inmune en presencia de agentes patógenos (Govind, 2008). El sistema inmune presenta receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) codificados en la línea germinal que pueden identificar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Vasta *et al.*, 2012). En los últimos años, se han incrementado los reportes acerca de la participación de las lectinas, como PRRs, en los mecanismos de inmunidad de crustáceos, se ha identificado su participación en todos los mecanismos inmunológicos en invertebrados (Sánchez-Salgado *et al.*, 2017). En un trabajo previo, se purificó y caracterizó la lectina sérica de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus* (CqL); se describió la especificidad hacia diferentes carbohidratos (Gal y NeuAc principalmente) y su posible participación en los mecanismos inmunológicos celulares de *C. quadricarinatus* (Sánchez-Salgado *et al.*, 2014). La clasificación general menciona 3 poblaciones celulares de hemocitos en los crustáceos: células hialinas, semi-granulares y granulares (Smith, 2010). Sin embargo, no existe un consenso general de cuáles es su participación en los mecanismos inmunológicos y como se relacionan con las lectinas.

En el presente trabajo, se identificó en los hemocitos un receptor de CqL, es una glicoproteína conformada por una subunidad de 120 kDa que está compuesta por una sola isoforma, en su conformación nativa, presenta un peso de 490 kDa. Se determinó que CqLr se localiza únicamente en los hemocitos granulares de *C. quadricarinatus* (8% de los hemocitos circulantes); CqL activa la producción de ROS

en los hemocitos, en presencia de los carbohidratos específicos para la lectina, Gal y NeuAc, se observa una inhibición de su actividad.

Existen pocos trabajos realizados sobre la identificación de los receptores para las lectinas séricas en crustáceos. En el camarón *L. setiferus* se reportó una lectina (LsL) que tiene su receptor en 85% de los hemocitos granulares; el receptor está constituido por dos subunidades de 61 y 52 kDa, es una glicoproteína que es reconocida por LsL, esta lectina participa en la producción de radicales libres de oxígeno y en presencia de carbohidratos N-acetilados, disminuye la generación de ROS (Alpuche *et al.*, 2009). En el cangrejo *M. japonicus* existe una galectina denominada MjGal; que reconoce tanto la superficie de los hemocitos como a agentes patógenos y participa en la activación del sistema de la fagocitosis (Shi *et al.*, 2014). En el camarón *F. chinensis* se reportó una lectina FcLec4, el receptor de esta lectina se identificó en los hemocitos, presenta una estructura de tipo β -integrina que promueve la fagocitosis (Wang *et al.*, 2014). Estos datos nos permiten concluir que CqL participa en la producción de ROS a través de una interacción con su receptor dependiente de carbohidratos específicos y podría activar estos mecanismos a través de vías de señalización intracelulares.

En los últimos años, se han realizado avances en la identificación de genes relacionados con proteínas que participan en las cascadas de señalización de los hemocitos de crustáceos (Li y Xiang, 2013). Se estableció la posible presencia de 3 vías de señalización relacionadas con el sistema inmune: la vía de JAK/STAT, la vía Toll y la vía IMD (Lemaitre y Hoffmann, 2007; Li y Xiang, 2013). No obstante, no se ha identificado cuáles de estas proteínas, actúan en la activación del proceso de

producción de especies reactivas del oxígeno. En el presente trabajo, se determinó que en presencia de CqL, los hemocitos granulares presentaron un aumento de proteínas fosforiladas; estos resultados concuerdan con la identificación del CqLr solo en esta población celular. Se ha establecido firmemente que la fosforilación está relacionada en las vías de señalización y en la posterior activación de las funciones celulares (Graves y Krebs, 1999). La interacción de CqL y su receptor inducen la fosforilación de proteínas que posiblemente estén asociadas a la transducción de señales que activen la producción de ROS en los hemocitos.

En el presente reporte se utilizaron inhibidores específicos para identificar moléculas que participen en las vías de activación de los hemocitos estimulados con CqL. En presencia de Piceatannol (inhibidor de tirosin cinasa SYK) (Seow *et al.*, 2002), Ly294002 (inhibidor PI3K) (Vlahos *et al.*, 1994), Gö6983 (inhibidor de PKC's convencionales) (Gschwendt *et al.*, 1996) y DPI (inhibidor de NADPH-oxidasa) (O'Donnell *et al.*, 1993) provocó una disminución en la generación de ROS. El ácido acetilsalicílico (AAS) es un inhibidor de la vía de las prostaglandinas mediante el bloqueo de la cicloxigenasa 2 (Chen *et al.*, 2012; Serhan *et al.*, 2008); la iodoacetamida (IAA) bloquea la glucólisis (Schmidt y Dringen, 2009). Estas dos moléculas también presentaron la capacidad de inhibir la producción de ROS. Por otro lado, la molécula SB203580, inhibidor específico de la quinasa p38MAPK (Kumar *et al.*, 1999); PD98059, inhibidor de la MEK1 y MEK2 (Sim *et al.*, 2005); Dexametasona, inhibidor de MAPK (Huo *et al.*, 2011); Azida de sodio (NaN₃), inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial (Maemura *et al.*, 2005) no disminuyeron significativamente la producción de ROS en los hemocitos estimulados con CqL.

La molécula SYK se ha asociado a una gran cantidad de receptores en la membrana de células pertenecientes al sistema inmune (Mócsai *et al.*, 2010). Se ha identificado que algunos receptores de tipo lectina inician la señalización intracelular con la participación de proteínas de tipo SYK (Kerrigan y Brown, 2011). Una de las moléculas, que se relaciona directamente a SYK es la quinasa PI3K; estas dos moléculas pueden generar complejos señalizadores (Mócsai *et al.*, 2010). Uno de los objetivos de SYK-PI3K son las proteínas de la familia de las PKC, una de sus principales funciones de las PKC es la fosforilación de las subunidades del sistema de la NADPH oxidasa para activarlo y producir ROS (Bréchar d *et al.*, 2013). Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que la unión de CqL y su receptor activa la señalización intracelular donde participan moléculas SYK, PI3K y PKC para el ensamblaje de la NADPH oxidasa que produce ROS en los hemocitos granulares de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

Por otro lado, el efecto de CqL sobre los hemocitos parece estar mediado por la inducción de cicloxigenasas y el metabolismo de la glucosa (Chen *et al.*, 2012; Serhan *et al.*, 2009; Schmidt y Dringen, 2009). Estos datos sugieren que la producción de radicales libres del oxígeno está relacionada con procesos metabólicos de la mitocondria y del ácido araquidónico.

Hasta el momento, no se ha descrito las vías de activación de este mecanismo en crustáceos, sin embargo, en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, se ha observado que PKC y PI3K participan en la producción de NOS de los hemocitos (García-García *et al.*, 2008). En el caracol *Lymnaea stagnalis*, se observó que la molécula PKC forma parte importante de la señalización intracelular que regula la producción de especies reactivas de oxígeno (Wright *et al.*, 2006). En *L. setiferus* y *P. vannamei*

se observó la participación de procesos metabólicos en la producción de radicales libres del oxígeno (Alpuche *et al.*, 2009; Sun, 2010).

Dentro del modelo *in vivo*, se identificaron incrementos en los CTH 2 h después del reto con ambos estimulantes, 12 h post inducción, no se hay diferencias significativas con respecto a los valores del grupo control. En otro trabajo, se realizaron retos inmunológicos en presencia de WSSV y una bacteria Gram (-) en la misma especie (Liu *et al.*, 2013); no se observaron variaciones significativas a las 6, 12 y 24 h post inducción, en cambio a las 48 h, bajo el estímulo viral, se observó una disminución (Liu *et al.*, 2013). Estos datos nos sugieren que la respuesta es dependiente del patógeno que es recocado por el organismo.

Con el estímulo de Zymosan A y LPS a las 2 h, hubo variaciones en los CDH en las poblaciones de hemocitos granulares y hialinos. Existen reportes sobre la variación de los conteos diferenciales tras retos inmunológicos en crustáceos; no obstante, los resultados no son comparables pues la mayoría de estos reportes se realizaron en intervalos de tiempo diferentes. Sin embargo, en el camarón *L. vannamei* se hicieron mediciones de estos valores en presencia de un estímulo con la bacteria *Vibrio alginolyticus* (Gram -) dentro de las primeras 24 h post-inducción; en las tres poblaciones de hemocitos, se observaron valores mínimos entre las 6 y 12 h post-inducción (Liu *et al.*, 2005). Estos datos difieren con respecto a los valores reportados en este trabajo ya que a las 12 h después del estímulo, no encontramos diferencias con el grupo control; este efecto puede ser debido a la implementación de un reto y dosis diferente.

En el presente reporte, se evaluó la presencia de CqLr y la actividad específica de la lectina presente en el suero tras estímulos en el modelo *in vivo*. En los hemocitos

granulares de *C. quadricarinatus*; encontramos aumento de la presencia de CqLr en presencia del estímulo con Zymosan A; con el reto de LPS, no hubo aumento en la marca de CqL en la membrana de los hemocitos. Se observó un aumento en la actividad específica de las lectinas en el suero a las 2 h y 12 h post-estimulo con Zymosan A, en cambio, en el grupo retado con LPS no aumentó significativamente. Existen reportes acerca de la cuantificación de genes relacionados con lectinas en crustáceos decápodos en presencia de retos inmunológicos con una gran cantidad de patógenos (Wang y Wang, 2013b). La mayoría de estos reportes mencionan un aumento en la cuantificación de mRNA de lectinas sin asociarlo con una actividad, en la langosta *P. clarkii* se identificó aumento en los niveles de lectina después del reto con de la bacteria *V. anguillarum* en la (Zhang *et al.*, 2016). Se ha sugerido la presencia de receptores que podrían reconocer a los β -glucanos en crustáceos (Wang y Wang *et al.*, 2013a). Nuestros resultados sugieren que el reconocimiento de β -glucanos podría estar relacionado con el aumento de la actividad de CqL en el suero y la presencia del receptor CqLr en la membrana de los hemocitos con la finalidad de activar la producción de ROS y colabore en la eliminación de los agentes patógenos. Es importante realizar más experimentos con la finalidad de esclarecer cual es la relación entre la lectina CqL y la respuesta a β -glucanos en la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*.

En conclusión, en este trabajo se identificó al receptor de CqL en las células granulares, la interacción de la lectina con su receptor es dependiente de carbohidratos específicos, esta interacción aumenta la fosforilación de proteínas en los hemocitos donde participan SYK, PI3K y PKC en las vías de activación que

aumenta la producción de ROS. En presencia de β -glucanos se observó un aumento en la actividad específica del suero y de la presencia de CqLr en los hemocitos. Esta información ayudará a entender el funcionamiento de los mecanismos inmunológicos celulares y aportará datos relevantes sobre la participación de las lectinas en la respuesta inmune innata.

CONCLUSIONES

La lectina sérica CqL reconoce una población de hemocitos granulares mediante su receptor (CqLr), este reconocimiento desencadena la fosforilación de proteínas al interior de la célula lo que aumenta la producción de especies reactivas del oxígeno. CqL participa en la regulación de la respuesta inmune contra agente patógenos de la langosta *C. quadricarinatus*.

PERSPECTIVAS

- 1.- Aislar y clonar el receptor CqLr en los hemocitos de *C. quadricarinatus*.
- 2.- Estructurar la vía de señalización desencadenada por la interacción de CqL y su receptor.
- 3.- Identificar la participación de CqL en la respuesta inmunológica en presencia de moléculas β -glucanos.

LITERATURA CITADA

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783 – 801.
- Alpuche, J., Rosas, C., Vázquez, L., Guevara, J., Pereyra, A., Agundis, C., Pascual, C., Zenteno, E., (2009) Activation of immunological responses in *Litopenaeus setiferus* hemocytes by a hemocyanin like-lectin. *Aquaculture*. 292: 11 - 15.
- Anderson, I. G., Prior, H. C. (1992) Baculovirus infections in the mud crab *Scylla serrata*, and a freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, from Australia. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 265 – 273-
- Bowater, R.O., Wingeld, M., Fisk, M., Kelly, M.L.C., Reid, A., Prior, H., Kulpa, E.C., 2002. A parvo-like virus in cultured redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* from Queensland, Australia. *Dis. Aquat. Org.* 50, 79–86.
- Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248 – 254.
- Bréchar, S., Plançon, S., Tschirhart, E.J. (2013). New insights into the regulation of Neutrophil NADPH oxidase activity in the phagosome: A focus on the role of lipid and Ca²⁺ signaling. *Antioxidants Amp. Redox. Signal.* 18: 661 – 676.
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster* from microbial recognition to whole organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 796 – 810.

- Chen, W., Ho, K., Leu, J., Liu, K., Wang, H., Kou, G., Lo, C. (2008) WSSV infection activates STAT in shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 1142 – 1150.
- Chen, B., Zhao, J., Zhang, S., Wu, W., Qi, R. (2012). Aspirin inhibits the production of reactive oxygen species by Downregulating Nox4 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Endothelial Cells Exposed to Oxidized Low-density Lipoprotein. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 59: 405 – 412.
- De los Rios, D., Zarco-Zavala, M., Olvera-Sanchez, S., Pardo, J. P., Juarez, O., Martinez, F., Mendoza-Hernandez, G., García-Trejo, J. J., Flores-Herrera, O., 2011. Atypical cristae morphology of human syncytiotrophoblast mitochondria: role for complex V. *J. Biol. Chem.* 27, 23911 – 23919.
- Edgerton, B.F., Evans, L.H., Stephens, F.J., Overstreet, R.M. (2002) Synopsis of freshwater crayfish diseases and commensal organisms. *Aquaculture.* 206: 57 – 135.
- García-García, E., Prado-Álvarez, M., Novoa, B., Figueras, A., Rosales, C. (2008). Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families. *Dev. Comp. Immunol.* 32: 637 – 653.
- Govind, S. (2008). Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Insect Sci.* 15: 29 – 43.
- Graves, J. D., Krebs, E. D. (1999) Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol. Ther.* 82: 111 -121.

- Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H.J., Johannes F.J. (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. FEBS Letters 392: 77 – 80.
- Herbert, B. (1987) Notes on diseases and epibionts of *Cherax quadricarinatus* and *C. tenuimanus* (Decapoda: Parastacidae). Aquaculture. 64: 165 – 173.
- Huo, Y., Rangarajan, P., Ling, E. A., Dheen, T. (2011). Dexamethasone inhibits the Nox-dependent ROS production via suppression of MKP-1-dependent MAPK pathways in activated microglia. BMC Neuroscience. 12: 49.
- Kerrigan, A.M., Brown, G.D. (2011). Syk-coupled C-type lectins in immunity. Trends in immunology. 32: 151 – 156.
- Kleino, A., Silverman, N., 2014. The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response. Dev. Comp. Immunol. 42, 25 – 35.
- Kumar, S., Jiang, M., Adams, J., Lee, J. (1999). Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. Biochem Bioph. Res. Co. 263: 825 – 831.
- Langdon, J., S. (1991) Description of *Vavraia parastacida* sp. nov. (Microspora: Pleistophoridae from marrow, *Cherax tenuimanus* (Smith), (Decapoda: Parastacidae). J. Fish Diseases. 14: 619 – 629.
- Lanz, H., Hernandez, S., Garrido-Guerrero, E., Tsutsumi, V., Aréchiga, H. (1993) Propheloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarkii*. Dev. Comp. Immunol. 17: 399 – 406.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. Annu. Rev. Immunol. 25: 697 – 743.

- Li, F., Xiang, J., (2013) Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 973 – 980.
- Li, H., Chen, Y., Li, M., Wang, S., Zuo, H., Xu, X., Weng, S., He, J., Li, C. (2015) A C-type lectin (LvCTL4) from *Litopenaeus vannamei* is a downstream molecule of the NF- κ B signaling pathway and participates in antibacterial immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 43: 257 – 263.
- Liu, C., Winton C., Chen, J. (2005). The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesized in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 18: 431 – 444.
- Liu, Y., Chang, C., Hseu, J., Liu, K., Tsai, J. (2013). Immune responses of prophenoloxidase and cytosolic manganese superoxide dismutase in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* against a virus and bacterium. *Mol. Immunol.* 56: 72 – 80.
- Longshaw, M. (2011) Diseases of: Crayfish. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 54 – 70.
- Maemura, K., Zheng, Q., Wada, T., Ozaki, M., Takao, S., Aikou, T., Bulkley, G., Klein, A., Sun, Z. (2005). Reactive oxygen species are essential mediators in antigen presentation by Kupffer cells. *Immunol Cell Biol.* 83: 336 – 343.
- Mócsai, A., Ruland, J., Tybulewicz, V. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* 10: 387 – 402.
- O'Donnell, V., Tew, D., Jones, O., England, P. (1993). Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil oxidase. *Biochem. J.* 290: 41 – 49.

- Peebles, J. (1977) A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 12: 173 - 180.
- Saoud, I., Ghanawi, J., Thompson, K., Webster, C. (2013) A review of the culture and diseases of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens 1868). *J. World Maric. Soc.* 44: 1-29.
- Sánchez-Salgado, J.L., Pereyra, M., Vivanco-Rojas, O., Sierra-Castillo, C., Alpuche-Osorno, J., Zenteno, E., Agundis, C. (2014) Characterization of a lectin from the crayfish *Cherax quadricarinatus* hemolymph and its effect on hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 39: 450 – 457.
- Sánchez-Salgado J.L., Pereyra M. A., Agundis C., Vivanco-Rojas O., Sierra-Castillo C., Alpuche-Osorno J. J., Zenteno E. (2017). Participation of lectins in crustaceans immune system. *Aquaculture Research*.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 1: 16 – 22.
- Schmidt, M., Dringen, R. (2009). Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. *Front. Neuroenergetics.* 1: 1 – 10.
- Seow, C., Chue, S., Wong, W. (2002) Piceatannol, a Syk-selective tyrosine kinase inhibitor, attenuated antigen challenge of guinea pig airways *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 443: 189 – 196.
- Serhan, C., Chiang, N., Van Dyke, T. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipids mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 349 – 361.
- Sharon, N. (2007) Lectins: Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 282: 2753 – 2764.

- Shi, X.Z., Wang, L., Xu, S., Zhang, X.W., Zhao, X.F., Vasta, G.R., Wang, JX. (2014) A galectin from the Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) functions as an opsonin and promotes bacterial clearance from hemolymph. PlosOne 9: e91794
- Sierra, C., Lascurain, R., Pereyra, A., Guevara, J., Martinez, G., Agundis, C., Zenteno, E., Vazquez, L., (2005) Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 29: 113 – 121.
- Sim, S., Yong, T., Park, S., Im, K., Kong, Y., Ryu, J., Min, D., Shin, M. (2005). NADPH Oxidase-Derived Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of ERK1/2 Is Required for Apoptosis of Human Neutrophils Induced by *Entamoeba histolytica*. J. Immunol. 174: 4279 – 4288.
- Smith, V. (2010). Immunology of Invertebrates: Cellular. Encyclopedia of Life Sciences eLS: 1 -12.
- Sun, J., Wang, A., Zhang, T. (2010) Flow cytometric analysis of defense functions of hemocytes from the Penaeid Shrimp, *Penaeus vannamei*. J. World Aquac. Soc. 41: 92 – 105.
- Sun, J. J., Lan, J. F., Zhao, X. F., Vasta, G. R., Wang, J. X. (2017). Binding of a C-type lectin's coiled-coil domain to the Domeless receptor directly activates the JAK/STAT pathway in the shrimp immune response to bacterial infection. PLoS Pathog. 13, e1006626. doi: 10.1371/journal.ppat.1006626.

- Tasumi, S., Vasta, G.R. (2007). A galectin of unique domain organization from hemocytes of the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) is a receptor for the protistan parasite *Perkinsus marinus*. J. Immunol. 179: 3086 – 3098.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S. (2013) Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish Shellfish Immunol. 34: 954 – 967.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350–4354.
- Valanne, S., Wang, J. H., Rämetsä, M., 2011. The *Drosophila* Toll Signaling Pathway. J. Immunol. 186, 649 – 656.,
- Vasta; G.R. (2012). Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. Adv. Exp. Med. Biol. 946: 21 – 36.
- Vázquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G, Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E. (2009) Review: Immunity mechanism in crustaceans. Innate Immun. 15: 179 – 188.
- Vlahos, C., Matter, W., Hui, K., Brown, R. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J. Biological Chem. 269: 5241 – 5248.
- Wang, P, H., Gu, Z, H., Wan, D, H., Zhang, M, Y., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J, H. (2011). The shrimp NF-κB pathway is activated by White Spot Syndrome Virus (WSSV) 449 to facilitate the expression of WSSV69 (ie1), WSSV303 and WSSV371. PlosOne 6: e24773.

- Wang, X-W., Wang, J-K. (2013a) Pattern recognition receptors acting innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 981- 989.
- Wang, X-W., Wang, J-K. (2013b) Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 39: 27 – 38.
- Wang, X.W., Zhao, X.F., Wang, J.X., (2014). C-type Lectin Binds to B-Integrin to Promote Hemocytic Phagocytosis in an Invertebrate. *J. Biol. Chem.*, 289, 2405 – 2414.
- Wen, R., Li, F., Sun, Z., Li, S., Xiang, J. (2013) Shrimp MyD88 responsive to bacteria and white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 34: 574 – 581.
- Witting, I., Braun, H. P., Schagger, H. P., 2006. Blue native electrophoresis. *Nat. Protoc.* 1, 418 – 428.
- Wright, B., Lacchini, A.H., Davies, A.J., Walker, A.J. (2006). Regulation of nitric oxide production in snail (*Lymnaea stagnalis*) defense cells: a role for PKC and ERK signaling pathways. *Biol. Cell.* 98: 265 – 278.
- Zhang, X., Wang, Y., Wang, X., Wang, L., Mu, Y., Wang, J. (2016) A C-type lectin with an immunoglobulin-like domain promotes phagocytosis of hemocytes in crayfish *Procambarus clarkii*. *Sci. Reports.* doi:10.1038/srep29924