



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

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL Y DETERMINACIÓN DE LA
ESPECIFICIDAD DE UNA LECTINA SÉRICA DEL LANGOSTINO *CHERAX*
QUADRICARINATUS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

BIOL. JOSÉ LUIS SÁNCHEZ SALGADO

TUTOR PRINCIPAL

DR. EDGAR ZENTENO GALINDO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTORAL

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

DRA. MARÍA LETICIA ARENA ORTIZ, UMDI SISAL, UNAM

DRA. CRISTINA PASCUAL JIMÉNEZ, UMDI SISAL, UNAM

DR. JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA, CISEI, INSP

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO, D.F. FEBRERO DEL 2013



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 el laboratorio 6 de Inmunología del departamento de bioquímica de la 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 (IN226211).

Agradezco el apoyo proporcionado por la beca CONACyT (376926), PAPIIT-UNAM, CONACyT - 0129932 y ECOS (M09S02) México - Francia; los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

A mi sobrina, te quiero mucho chaparra, recuerda que los logros se consiguen con mucho trabajo y esfuerzo, pero sobre todo por un motivo... TÚ.

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: Dr. Juan José Alpuche Osorno, Dr. Humberto Lanz Mendoza, Dra. Cristina Pascual Jiménez, Dra. Leticia Arena Ortiz y al Dr. Roberto Arreguin Espinoza por enriquecer este proyecto con sus comentarios y sugerencias.

Al Dr. Mohamed Alí Pereyra Morales y a la Dra. Concepción Agundis Mata por tener la paciencia y la dedicación de enseñarme tantas cosas, sin el apoyo de ustedes no se habría culminado este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi queridísima novia Wen, gracias por estar a mi lado durante tanto tiempo, por escucharme y sobre todo por alentarme a culminar esta etapa tan importante en mi vida.

A la familia: Mi madre, mi padre, Cris, Vic y Mari Fer por ser un soporte esencial en mi desarrollo tanto académica como personalmente, apoyarme en todos los momentos que los he necesitado y por ser un ejemplo a seguir, gracias a todos Uds.

A la familia del Laboratorio: Joserra, Alí, La jefa, Miriam, Tania y Djamila por ser tan buenos amigos y compañeros en el laboratorio, hacer de cada uno de mis días único y aprender tantas cosas juntos.

A mis viejos amigos: Alf, Cory, Enano, Franco y Mike que me han acompañado a lo largo de mi vida, gracias por esas platicas interminables, por todas las palabras de animo y anhelo durante este proyecto.

PREFACIOS

Los resultados de este proyecto fueron presentados en los siguientes eventos:

- Primer congreso de alumnos de posgrado de la UNAM, Ciudad Universitaria, México, D.F., Mayo del 2011. Poster: Caracterización de la lectina sérica y determinación de su participación en la respuesta inmune de la langosta *Cherax quadricarinatus*.
- 1er Congreso Latinoamericano de Glicobiología, Ciudad de Oaxaca de Juárez, México del 4 al 7 de Agosto del 2011. Poster: Caracterización de una lectina sérica y determinación de la participación en la respuesta inmune de la langosta *Cherax quadricarinatus*.
- XX Congreso Nacional de Inmunología, Ciudad de Mérida, Yucatán del 17 al 21 de Abril del 2012. Poster: Caracterización de la lectina sérica de la langosta de *Cherax quadricarinatus*.

INDICE

ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS.	11
LISTA DE TABLAS.	13
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN.	
Biología de <i>Cherax quadricarinatus</i> .	15
Sistema circulatorio y mecanismos de defensa.	16
Generalidades de las lectinas.	17
Mecanismos de la fagocitosis.	21
JUSTIFICACIÓN.	23
HIPÓTESIS.	24
OBJETIVOS.	
Objetivo general.	25
Objetivos particulares.	25
METODOLOGÍA.	
Organismos.	26
Purificación de la lectina.	26
Caracterización bioquímica de la lectina CqL	
Determinación de la concentración de proteínas.	27
Determinación del peso molecular.	28
Determinación del peso molecular nativo.	28
Electroforesis en dos dimensiones.	29

Secuencia de la lectina por espectrometría	30
Análisis de composición de carbohidratos.	31
Análisis de composición de aminoácidos.	31
Actividad hemaglutinante.	31
Especificidad por Carbohidratos.	32
Dependencia por Cationes Divalentes.	33
Participación de CqL en el mecanismo de la fagocitosis	
Viabilidad celular.	33
Adhesión celular.	34
Producción de anticuerpos policlonales.	34
Inmunocitoquímica.	35
Determinación de la generación de anión superóxido.	36
RESULTADOS.	
Purificación de lectina.	37
Peso molecular nativo	38
Peso molecular de la lectina SDS-PAGE	39
Electroforesis en dos dimensiones	40
Análisis proteómico	41
Análisis de la composición de azúcares	41
Análisis de la composición de aminoácidos	42
Actividad Hemaglutinante	43
Especificidad por carbohidratos y glicoproteínas	44
Efecto de cationes divalentes en la actividad aglutinante de CqL	45

Inmunocitoquímica.	46
Generación de anión superóxido.	46
DISCUSIÓN.	49
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	60
REFERENCIAS.	61
ANEXOS	71

ABREVIATURAS

ASB	Albumina sérica bovina
CqL	Lectina de <i>Cherax quadricarinatus</i>
DO	Densidad óptica
DRC	Domino de reconocimiento a carbohidrato
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FIT-C	Isotiocianato de fluoresceína
FPLC	Cromatografía líquida de separación rápida de proteínas
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-D- galactosamina
GlcNAc	N-acetil-D- glucosamina
Glc	Glucosa
LPS	Lipopolisacáridos
MALDI-ToF	Espectrofotometría de masas asistida por láser
ManNAc	N-acetil Manosamida
MEP	Mucina estomacal porcina
Mr	Masa relativa
MrL	Lectina sérica de <i>M. rosenbergii</i>
MSB	Mucina submaxilar bovina
NBT	Azul de tetrazolium
NeuAc	Acido siálico
PAGE	Gel de acrilamida para electroforesis
PBS	Amortiguador fosfato salino
PM	Peso molecular
ProFO	Profenoloxidasa
PVDF	Poli-divinil-Sulfona
ROIs	Reactivos intermediarios del oxígeno
Rf	Distancia de migración de la proteína/distancia de migración del colorante
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOD	Superoxido dismutasa
UHA	Unidades hemaglutinantes
WSSV	Virus del síndrome de la mancha blanca

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil de elusión de CqL por cromatografía de afinidad. La lectina fue eluída adicionando ácido acético al 3%. 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 rata al 2% ; a las fracciones eluídas con ácido acético se ajustó el pH a 7 con NaOH 1M previo al ensayo de aglutinación.

Figura 2. Determinación del peso molecular nativo de la lectina CqL (♦) en condiciones no desnaturalizantes por cromatografía de 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).

Figura 3. Perfil electroforético de la lectina CqL en SDS-PAGE con Urea. A) 20 µg de CqL purificada por cromatografía de afinidad. B) Marcadores de peso molecular: Miosina (200 kDa), β -galactosidasa de E. coli (116 kDa), β -fosforilasa de conejo (97.4kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica de bovino (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lisosima (14kDa).

Figura 4. Electroforesis en dos dimensiones de CqL. Marcadores de peso molecular: Miosina (200 kDa), β-galactosidasa de E. coli (116 kDa), β-fosforilasa de conejo (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa),

anhidrasa carbónica de bovino (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lizosima (14kDa).

Figura 5. Efecto de cationes en la actividad aglutinante de CqL. CaCl_2 (◆), MgCl_2 (▲) o MnCl_2 (■) en presencia de eritrocitos de rata al 2% en solución salina.

Figura 6. Microscopia de fluorescencia de hemocitos de *Cherax quadricarinatus* marcados con anti-CqL y revelados con conjugado de anticuerpo cabra anti-conejo acoplado a FITC. A) Control negativo 100x. B) Marcaje positivo de color verde en membrana celular anti-CqL 100x. C) Marcaje positivo de color verde en gránulos citoplasmáticos anti-CqL 100X.

Figura 7. Mecanismos de defensa relacionados con lectinas séricas en crustáceos.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas de lectinas reportadas en otros crustáceos decápodos.

Tabla 2. Purificación de la lectina sérica del langostino *Cherax quadricarinatus* por cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos de rata.

Tabla 3. Composición de aminoácidos en las subunidades de CqL.

Tabla 4. Actividad hemaglutinante de la lectina de *Cherax quadricarinatus* con diferentes tipos de eritrocitos.

Tabla 5. Especificidad de CqL por carbohidratos y glicoproteínas.

Tabla 6. Efecto de CqL en la producción de anión superóxido en los hemocitos de *Cherax quadricarinatus*

Tabla 7. Especificidad de la lectina de *Cherax quadricarinatus* por diferentes carbohidratos y su producción de anión superóxido.

RESUMEN

Actualmente el langostino *Cherax quadricarinatus* representa un gran potencial económico, en años recientes se ha hecho un importante avance en el conocimiento de los mecanismos de defensa hacia las enfermedades que presentan el grupo de los crustáceos, sin embargo no se ha esclarecido por completo los mecanismos de reconocimiento hacia estos agentes patógenos. Es por ello que en el presente trabajo se purificó y caracterizó una lectina sérica del langostino *Cherax quadricarinatus* (CqL), presentó un peso molecular nativo de 290 kDa, en condiciones desnaturalizantes se determinó que es un heterotrímero ya que está formada por tres subunidades de 108, 80 y 29 kDa en las cuales se observó la presencia de isoformas. CqL está compuesta principalmente por Gly, Glx y Ala y no posee carbohidratos en su estructura. Mediante el análisis de espectrometría de masa no se encontró homología de CqL con ninguna estructura reportada. CqL mostró una especificidad por los eritrocitos de rata y conejo, las pruebas de inhibiciones arrojaron un reconocimiento por ácido siálico, MSB, Fetuina; por otra parte reconoció la Gal que está presente en la MEP, dando una buena afinidad por esta glicoproteína. Al remover el ácido siálico de los eritrocitos no se eliminó por completo la capacidad de reconocimiento sacarídicas debido a la especificidad por Gal. CqL aumentó la producción de anión superóxido de los hemocitos, al incubar la lectina sérica con los monosacáridos Gal y Glc se vio inhibida su actividad 94% y 82% respectivamente. Mediante técnicas de inmunocitoquímica se observó la presencia de CqL principalmente en los gránulos citoplasmáticos donde podría estar almacenada, mientras que en la membrana celular podría participar en el reconocimiento de estructuras sacarídicas asociadas a agentes patógenos, formando parte de la serie de mecanismos de inmunidad que favorecen la eliminación de dichos organismos.

INTRODUCCIÓN.

Biología de Cherax quadricarinatus.

El langostino *Cherax quadricarinatus* presenta ventajas para la acuicultura exitosa, el ciclo de vida de estos organismos es simple, su estado larvario es libre y se alimentan de dieta sencilla. Este decápodo presenta alta adaptación en cautiverios, puede sobrevivir en agua con baja concentración de oxígeno disuelto de hasta 4 mg/L o en temperaturas en un intervalo de 16 – 32 ° C durante periodos cortos, además de presentar una tasa de crecimiento muy alta (3.6 % por día) (Doeller *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2003). En México, la tecnología de cultivo se encuentra en etapa de desarrollo, debido a que es una especie económicamente viable ya que permite obtener tallas comerciales (60-90 g) en ciclos de aproximadamente siete meses y con buena aceptación en el mercado que se traduce en precios a pie de granja de US \$10.00-16.00/Kg (Villarreal y Naranjo, 2008), esta especie es susceptible de estudios a fin de mejorar su cultivo y obtener mayor aceptación en el mercado. En el 2009, CONAPESCA reportó la producción del país en 2,212 toneladas. Los principales estados productores de langosta son Veracruz (1,219 t.), Tabasco (565 t.) y Guerrero (268 t.), (Morelos no está considerado en esta tabla de producción) esta cifra representa la mayor producción anual reportada hasta el momento y pone de manifiesto el crecimiento constante en el país (CONAPESCA, 2009).

Sistema circulatorio y mecanismos de defensa.

Los estudios realizados en inmunología de invertebrados se han orientado a la identificación de los mecanismos de defensa y su activación durante procesos infecciosos, así como a los factores que llevan a cabo la regulación y destrucción de patógenos (Vázquez *et al.*, 2009). El sistema circulatorio de los crustáceos es abierto, donde los nutrientes, el oxígeno, las hormonas y las células están distribuidos en la hemolinfa. Los hemocitos (células circulantes posibles análogos de los leucocitos presentes en vertebrados), están involucradas en el reconocimiento y eliminación del material ajeno así como en el proceso de la coagulación (Vázquez *et al.*, 2009); se ha demostrado que algunos factores presentes en la hemolinfa o en algunos grupos celulares poseen alta capacidad de reconocimiento a material extraño (Vasta *et al.*, 1999).

Las barreras físicas, en todos los organismos multicelulares son la primera línea de defensa contra los agentes patógenos y son esenciales para su sobrevivencia (Cerenius *et al.*, 2010). Cuando los microorganismos invaden tejidos, se activan inmediatamente diferentes mecanismos que hacen posible la eliminación o disminución de los patógenos en el organismo, estos procesos incluyen la activación del sistema de la profenoloxidasa (proFO), activación de la cascada de la coagulación, las lectinas, la encapsulación y el proceso de la fagocitosis así como la liberación de proteínas y/o péptidos con actividad antimicrobiana o fúngica (Iwanaga y Lee, 2005). Recientemente se han hecho grandes aportes a las vías

de señalización a partir de reconocimiento de patógenos y la generación de mecanismos de defensa (Lin y Soderhall., 2011).

Generalidades de las lectinas.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos específicos que se expresan en las superficies celulares, tienen diferentes funciones biológicas como participar en la migración celular, en el transporte de carbohidratos o glicoproteínas, la adhesión celular entre otras. En crustáceos se ha reportado la localización de lectinas en la membrana de los hemocitos, en gránulos citoplasmáticos y en forma soluble en la hemolinfa; mediante la identificación de patrones moleculares asociados a patógenos, por los dominios de reconocimiento a carbohidratos (CDR) en su estructura, dentro de los mecanismos de defensa se les ha atribuido la participación en los procesos de fagocitosis, encapsulación, aglutinación y reconocimiento del material ajeno al organismo (Zänker, 2010, Sahoo *et al.*, 2007; Vasta *et al.*, 2007).

Entre las investigaciones realizadas en crustáceos hay algunos trabajos sobre lectinas estudiadas en organismos dulceacuícolas, entre ellos se encuentra el del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, cuya lectina es una proteína multimérica con subunidades de 8-10 kDa, requiere de cationes divalentes para su funcionamiento; y presenta un reconocimiento a eritrocitos de ratón, su actividad hemaglutinante se inhibe con ácido siálico y glicoproteínas sialiladas como la mucina submaxilar bovina (MSB) (Vázquez *et al.*, 1993). En *Liocarcinus depurator* se reportó una lectina compuesta por subunidades de 38 kDa con un punto

isoeléctrico de 6.0, presenta reconocimiento específico a los eritrocitos de ratón, Neu5Ac y sustituciones en la estructura del ácido siálico (Fragkiadakis y Stratakis., 1997). En el cangrejo de agua dulce *Paratelphusa jacquemontii* se reportó una lectina de 34 kDa y reconocimiento específico a mucina submaxilar bovina (MSB), la cual contiene principalmente ácido neuramínico (Neu5Ac), ácido 9-O-acetil neuramínico (Neu5,9Ac) y ácido 8,9 di-O-N acetil neuramínico (Neu5,8,9Ac) (Denis *et al.*, 2003).

En la literatura se encuentran trabajos realizados sobre lectinas de organismos marinos principalmente en camarones, tal es el caso de *Litopenaeus setiferus* donde se reportó una lectina formada por un heterotetrámero de dos subunidades de 80 kDa y dos de 52 kDa, en su composición de aminoácidos se reportaron principalmente ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), alanina (Ala) y glicina (Gly); esta lectina reconoce N-acetil glucosamina (GlcNAc), N-acetil galactosamina (GalNAc), Neu5Ac, y glicoproteínas como la MSB y la fetuina (Alpuche *et al.*, 2005). En el camarón *Fenneropenaeus chinensis* se reportó una lectina sérica dependiente de Ca^{2+} compuesta por dos subunidades de 34 kDa y 40 kDa, con especificidad por carbohidratos N-acetilados, particularmente ácido siálico y mucina submaxilar bovina y fetuina (Sun *et al.*, 2008). Rittidach *et al.*, (2007) purificaron una lectina de 316.2 kDa de la hemolinfa del camarón bananero *Fenneropenaeus merguensis*, compuesta por subunidades de 32.3 y 30.9 kDa, se determinó su punto isoeléctrico en 6.0, presenta dependencia de Ca^{2+} y es inhibida por ManNAc, GlcNAc, GalNAc, NeuNAc así como por las glicoproteínas

fetuína y mucina estomacal porcina, dentro de las pruebas de hemaglutinación selectiva presentó reconocimiento a *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*, esta aglutinación fue inhibida completamente por NeuAc.

Tabla 1. Características bioquímicas de lectinas reportadas en otros crustáceos decápodos.

Organismo	Especificidad	Subunidad	Referencia
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	GlcNAc, GalNAc, Fet, Neu5Ac	9.6 kDa	Vázquez <i>et al.</i> , 1993
<i>Potamon potamios</i>	Gal	55 kDa	Fragkiadakis. 2000
<i>Liocarcinus depurator</i>	Neu,5,7,8,9Ac.	38 kDa	Fragkiadakis y Stratakis., 1997
<i>Paratelphusa jacquemontii</i>	NeuAc, MSB	34 kDa	Denis <i>et al.</i> , 2003
<i>Litopenaeus setiferus</i>	GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac, MSB, Fetuina	80-52 kDa	Alpuche <i>et al.</i> , 2005
<i>Penaeus mondon</i>	Gal, Glc, NeuAc	18 kDa	Luo <i>et al.</i> , 2006
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	Gal, Man	36. 2 kDa	Rattanaporn y Utarabhand, 2011
<i>Litopenaeus vannamei</i>	Gal, Man	37.2 kDa	Ma <i>et al.</i> , 2007
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	NeuAc, MSB, Fet	34-40 kDa	Sun <i>et al.</i> , 2008
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	ManNAc, GlcNAc, GalNAc, NeuNAc, MSB, Fet.	32.3-30.9 kDa.	Rittidach <i>et al.</i> , 2007

GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina, GalNAc: N-acetil-D-galactosamina, NeuAc: Ácido neuroamínico, ManNAc: N-acetil-D-manosamina, Gal: Galactosamina, Man: Manosa, , MSB: mucina submaxilar bovina; Fet: Fetuina.

En años recientes se ha ampliado el conocimiento sobre la variedad del reconocimiento hacia diferentes carbohidratos en las lectinas de crustáceos decápodos; en el cangrejo *P. potamios* se reporta una lectina formada por subunidades de 55 kDa y con actividad aglutinante hacia eritrocitos de conejo y especificidad para Gal (Fragkiadakis, 2000). Los camarones *L. vannamei* y *F. merguensis* presentan un CDR con reconocimiento por Gal y otro por Man, el peso molecular de ambas lectinas se encuentra en el rango de los 36 y 37 kDa (Ma *et al.*, 2007; Rattanaporn y Utarabhand, 2011); se ha descrito la lectina del camarón *P. mondon* de 18 kDa con una afinidad hacia Gal, Glc y NeuAc (Luo *et al.*, 2006). Dentro del grupo de los crustáceos se han descrito la presencia de varias lectinas presentes en la hemolinfa, en la langosta americana *Homarus americanus* se reportaron cuatro lectinas diferentes con características bioquímicas particulares (Battison and Summerfield., 2009). Por otro lado se han reportado variaciones de la capacidad hemaglutinante de la hemolinfa dependiendo de la cantidad de proteínas presentes en el alimento en los camarones *L. setiferus* y *L. vannamei* (Pascual *et al.*, 2004; Goimier *et al.*, 2006).

Entre las investigaciones realizadas en invertebrados se encuentran algunos trabajos sobre la funciones que llevan a cabo las lectinas en la fisiología de los organismos, se ha descrito que pueden participar en funciones de tipo simbióticas así como en el proceso de desarrollo dentro de los estados larvarios de algunos invertebrados, también se les ha atribuido la participación en la reproducción y en el transporte de nutrientes (Viswambari *et al.*, 2010). Así mismo se ha descrito la

participación de las lectinas en la mayoría de los sistemas de defensa en crustáceos, se ha reportado su presencia en los procesos de encapsulación y nodulación (Ling y Yu., 2006), en el mecanismo de la profenoloxidasa (Wang *et al.*, 2011), en la actividad antimicrobiana (Sun *et al.*, 2008), tienen un papel importante en la respuesta antiviral (Ma *et al.*, 2007) así como en el sistema de la fagocitosis y producción de anión superóxido (Sierra *et al.*, 2005).

Mecanismo de la fagocitosis.

En los crustáceos decápodos los hemocitos realizan el proceso de la fagocitosis, éste mecanismo inicia con el reconocimiento y la unión al objetivo seguido por la modificación del citoesqueleto y el transporte vesicular intracelular hacia el fagosoma (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). En el proceso de la destrucción del patógeno intervienen varias moléculas como son: las enzimas lisosomales, algunas de estas han sido caracterizadas en el grupo de invertebrados como son fosfatasas, esterases y proteasas entre otras; igualmente participan las especies reactivas de oxígeno que incluyen el peróxido de hidrógeno, hipohaluros y otros reactivos generados por el sistema de la NADPH oxidasa, también están presentes péptidos antimicrobianos con alta capacidad bactericida. Todos estos agentes intervienen en conjunto dentro del fagolisosoma participando en la destrucción de los patógenos (Smith., 2010).

Un grupo de moléculas que lleva a cabo el reconocimiento del material extraño son las lectinas, estas proteínas reconocen estructuras específicas de carbohidratos presentes en la superficie de los patógenos (Vázquez *et al.*, 2009).

En el camarón *L. setiferus* se ha sugerido que las lectinas son capaces de potencializar la fagocitosis, también proponen que las lectinas actúan uniendo polisacáridos presentes en bacterias u otros organismos con los receptores de membrana de los hemocitos (Alpuche *et al.*, 2009). En la langosta *Procambarus clarkii* se observa la participación de la lectina Pc-Lec1 como medio de opsonización (Zhang *et al.*, 2011). A pesar de los estudios realizados hasta el momento, existe poca información acerca de la relación entre el enlace específico de las lectinas que previamente han reconocido partículas ajenas al organismo y la superficie de fagocito (Márquez y Barranco, 2000).

Justificación.

En años recientes se han presentado numerosos casos patológicos causados por agentes infecciosos y parasitarios que incluyen los virus, bacterias, hongos, protozoarios y metozoarios, estos organismos han afectado la acuicultura de crustáceos en México y en el mundo, el virus responsable del síndrome de la mancha blanca y las bacterias pertenecientes al genero *Vibrio* son las especies que generan mayores pérdidas. Los estudios realizados en organismos invertebrados mencionan que aparentemente existe una ausencia de moléculas y/o células con funciones propias de la inmunidad adaptativa, uno de los mecanismos para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos es mediante las lectinas que están presentes en la hemolinfa, son moléculas con una alta especificidad de reconocimiento a ciertos carbohidratos, generalmente el reconocimiento es a NeuAc; así mismo, se han reportado con una heterogeneidad en los pesos moleculares, en la estructura y composición de aminoácidos. En este proyecto se determinó las características bioquímicas de una lectina sérica de *Ch. quadricarinatus* y su participación en la activación de los mecanismos de defensa del langostino a fin de dilucidar las vías de acción de la lectina contra patógenos, y así, en trabajos futuros, generar información básica sobre el sistema inmunológico de la especie y con ello aportar datos que puedan ser relevantes para el entendimiento y manejo de las enfermedades infecciosas durante el cultivo.

Hipótesis

El langostino *Cherax quadricarinatus* posee una lectina sérica que participa en los mecanismos de respuesta innata, comparte especificidad y características bioquímicas presentes en lectinas de otros crustáceos dulceacuícolas.

Objetivo general.

Determinar las características bioquímicas y funcionales de una lectina sérica de *Cherax Quadricarinatus*.

Objetivos particulares.

1. Purificar una la lectina sérica de *Cherax quadricarinatus*.
2. Caracterizar bioquímicamente a la lectina (CqL) el peso molecular, composición de carbohidratos y aminoácidos.
3. Determinar la especificidad de CqL hacia diferentes sacáridos y glicoproteínas.
4. Purificación de anticuerpos anti-CqL
5. Identificar la localización celular de CqL mediante anticuerpos anti-CqL.
6. Determinar la participación de CqL en el mecanismo de fagocitosis.

Metodología.

Organismos.

Fueron utilizados langostinos adultos machos obtenidos del criadero “El Higuero” ubicado en el municipio de Jojutla, Morelos (18°36´N, 99°10´O), los organismos fueron capturados manualmente para evitar lesiones. El transporte de los langostinos se llevo 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 25°C así como suministro de alimento comercial de la marca Malta Cleyton tres veces por semana, la densidad de la población se mantuvo en 6 organismos por m². Se determinó el estado de intermuda siguiendo la metodología descrita por Peebles, J. (1977); el área fue esterilizada con alcohol etílico al 70%, la punción fue del seno pericardial, en la base del primer segmento abdominal utilizando una jeringa con aguja de 21g x 32mm por cada organismo, posteriormente la muestra fue colocada en tubos de plástico estériles a 4°C. Para obtener el suero, se centrifugó la hemolinfa a 300 x g por 10 min a 4°C y se almacenó a -70 °C hasta su uso posterior.

Purificación de la lectina.

Para la preparación del estroma de eritrocitos se utilizaron ratas adultas hembras de la cepa Wistar, la sangre que se obtuvo se lavó en tres ocasiones con PBS (0.01 M de Na₂PO₄ y KH₂PO₄, 0.15 M NaCl, 15 mM CaCl₂ pH 7.4), posteriormente

se lisaron los eritrocitos y se centrifugaron durante 15 min. a 35,000 x g a 4 °C; posteriormente se colocaron en glutaraldehído a una concentración final 1 % durante toda la noche a 4 °C en agitación leve. Se lavó el estroma de eritrocitos hasta retirar el glutaraldehído, al termino se colocó el estroma en glicina a una concentración final 1 M durante toda la noche a 4 °C en agitación leve. Por ultimo se lavó el estroma para retirar la glicina. Se montó la columna de afinidad con Sephadex G-25 medio (Pharmacia Chemicals, Upsala, Sweden).

La obtención del suero se realizó mediante una punción en la zona pericárdica extrayendo 1mL de hemolinfa sin anticoagulante, 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. La purificación de la lectina se realizó aplicando 1 mL de suero del langostino *Cherax quadricarinatus* a la columna equilibrada previamente con PBS. La fracción no retenida se lavó con PBS y la lectina se eluyó de la matriz de afinidad por la adición de ácido acético al 3 % de acuerdo con el método descrito por Vázquez *et al.*, (1993). El flujo de la columna fue de 20 mL/h, se colectaron fracciones de 1 mL y se determinó su densidad óptica (DO) a 280 nm. La fracción retenida se dializó contra solución salina y se determinó su actividad aglutinante con eritrocitos de rata. Las muestras se mantuvieron a –70 °C hasta su uso.

Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, con azul de Coomassie G-250 y albúmina sérica bovina (ASB) 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.

El grado de homogeneidad de la lectina, obtenida por cromatografía de afinidad, se evaluó por electroforesis en gel de poliacrilamida con urea de acuerdo al método descrito por Bollag *et al.*, (1991), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% con Urea. Las muestras contenían entre 20 a 40 µg de lectina, se mezclaron en proporción 1:1 con amortiguador de muestra (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20 %, Urea 6 M, SDS 4 %, DTT 0.2 M, azul de bromofenol 0.02 %, pH 8.8). Se emplearon estándares de peso molecular conocido, con un rango de 6.5 a 200 kDa (BioRad, Richmond CA,USA). La migración electroforética se realizó aplicando voltaje constante de 80 V, en un amortiguador de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192, y SDS 0.1 %, pH 8.3). Los Rf de los estándares se calcularon 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 se calcularon en la gráfica de PM vs. Rf, interpolando los valores del Rf de las subunidades de lectina en la curva estándar.

Determinación del peso molecular nativo.

Para determinar el peso molecular en condiciones nativas de la lectina, se aplicaron 500 µg de CqL purificada por cromatografía de afinidad a una columna de filtración en gel (1.6 x 100 cm, Pharmacia, Upsala, Suecia®) conteniendo

Sephacryl SH-300 conectada a un equipo de cromatografía líquida de separación rápida de proteínas (FPLC), la columna se equilibró previamente con solución salina colocando en seguida marcadores de pesos moleculares nativos (Sigma), el flujo fue de 12 ml/h, se colectaron fracciones de 1 mL y se monitoreó la DO a 280 nm. El peso nativo de la fracción de lectina se obtuvo mediante la relación K_{av}/M_r , en donde K_{av} esta dada por los volúmenes de elución y M_r es la masa relativa de los estándares de pesos moleculares conocidos.

Electroforesis en dos dimensiones.

Se prepararon las muestras (40 μ g de CqL) utilizando solución de rehidratación (urea 8M, CHAPS 0.5 %, DTT 0.2 %, IPG Buffer pH 3-10, 0.5 %, azul de bromofenol 0.002%), hasta obtener un volumen total de 130 μ L. Se vertieron las muestras en los carriles de la bandeja de rehidratación (Amersham, Biosciences), se colocaron tiras de poliacrilamida de 7 cm de longitud y un rango de pH 3 a 10, (GE Healthcare, Bio-sciences). Cada carril se cubrió con aceite mineral e incubó a temperatura ambiente por toda la noche. Posteriormente, se colocaron las tiras en la cámara (Multiphor II Amersham, Biosciences) y se corrió la primera dimensión en tres fases: la primera a 200 V, por 1 min, a 0.001 kilovolts por hora (kVh); la segunda a 3500 V, por 90 min, a 2.8 kVh, y finalmente a 3500 V, durante 35 min a 2.2 kVh. Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron en 10 mL de amortiguador de equilibrio (Tris HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30 %, SDS 2 %, y azul de bromofenol 0.002 % y DTT 65 mM), en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente, se desechó la solución anterior y se incubó nuevamente con 10 mL de amortiguador de equilibrio, conteniendo iodoacetamida

135 mM durante 15 min, en agitación constante. El gel separador se preparó con acrilamida al 12.5 %, en una cámara de electroforesis vertical, en la parte superior se situó la tira con el marcador de peso molecular embebido en un gel de agarosa al 0.5 %, la electroforesis se corrió a 80 V por 4 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie.

Secuencia de la lectina por espectrometría

Después de la separación por electroforesis, las bandas conteniendo las fracciones de proteína, fueron retiradas del gel con una hoja de bisturí y sometidas a hidrólisis con 50 µg de tripsina en 500 µL 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 las muestras digeridas se secaron por evaporación usando un Gyrovap (Howe, Londres) y fueron preparadas directamente mezclando 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 se determinaron 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 se compararon en la base de datos NCBI nr 20110610.

Análisis de 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 neutralizó con AgNO₃, pH 6.0. Posteriormente, se re-acetiló con anhídrido acético en oscuridad absoluta durante toda la noche y se procedió a extraer los ácidos grasos con heptano. La muestra secada con una corriente de N₂, se resuspendió en piridina y se realizó la derivación de los alditoles liberados con trifluoroacético. El análisis de los derivados trifluoro-acetil alditoles se efectuó en un cromatógrafo de gases modelo Varian 2100 (Orsay, France) equipado con un detector de flama.

Análisis de 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 Durrum 500 de acuerdo con método de Bildlingmeyer *et al.*, (1984), utilizando norleucina como estándar interno.

Actividad hemaglutinante.

Eritrocitos de diferentes especies de animales (conejo, rata, ratón, cuyo), obtenidos del Bioterio de las Facultad de Medicina, UNAM y humano ABO se colocaron en una solución anticoagulante estéril de Alsever, se lavaron 3 veces a 300 x g por 10 min con amortiguador salino-fosfatos (PBS). La actividad

hemaglutinante se midió por microdilución seriada en placas de 96 pozos con fondo en U (NUNC, Dinamarca), se utilizaron 25 μ L de suero más 25 μ L de una suspensión de eritrocitos (de cada una de las especies a determinar) al 2% en PBS. Por otro lado los eritrocitos se trataron con sialidasa (Sigma), este tratamiento se llevo acabo con el fin de remover los NeuAc terminales de las estructuras sacarídicas de los eritrocitos, se utilizaron 0.2 unidades por mL de paquete celular durante 30 min a 37 °C. Por otro lado los eritrocitos se incubaron con tripsina (Sigma) para remover las proteínas presentes en la membrana celular, se incubaron los eritrocitos a una concentración final de 0.5 mg/mL de tripsina por una hora a temperatura ambiente, al termino de los tratamientos se lavaron las células dos veces con PBS. Los resultados fueron expresados como unidades hemaglutinantes (UHA) (UHA: el inverso de la dilución del último pozo con actividad aglutinante ajustado a 1 mL 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 azúcares y glicoproteínas que se usaron, fueron: Man, Fuc, Gal, Glc, GalNH₂, GlcNH₂, Metil α -D-Galactopiranososa, Metil α -D-Manopiranososa, GalNAc y GlcNAc, para estos azúcares la concentración inicial fue de 200 mM; ácido neuramínico (NeuAc o ácido siálico), Fet, MSB, MEP y Albumina Sérica Bovina (ASB) se usaron en concentraciones de 10 mg/mL. Cada muestra se diluyó de forma seriada con PBS se incubaron con un volumen igual de CqL (manteniendo

constante la actividad de lectina, considerando un título de 1:4) por 30 min a 37 °C y se añadieron en seguida eritrocitos de rata al 2%. La capacidad de inhibición fue expresada como la concentración mínima de azúcar requerida para inhibir 4 UHA (Vázquez *et al.*, 1997).

Dependencia por Cationes Divalentes.

La dependencia por cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+}) se midió por hemaglutinación con eritrocitos de rata (2%). La lectina se dializó previamente con EDTA 0.1 M en ácido acético 0.1 N durante una noche a 4°C y posteriormente contra agua destilada. Alícuotas de la lectina (30 μg) fueron incubadas con diversas concentraciones de cationes (CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , de 3 a 0.1 mM en PBS) durante 30 min a 37°C, y posteriormente se realizaron los ensayos de actividad aglutinante utilizando una suspensión de eritrocitos de rata al 2% en PBS.

Viabilidad Celular

Se tomó una alícuota de hemolinfa con anticoagulante, se realizó un conteo total de células en un hematocitómetro. Se colocaron alícuotas de 200 μL , se centrifugaron a 280 x g. durante 5 min a 4°C, se suspendió el paquete celular en 500 μL en las soluciones: DMEM, RPMI (Gibco, USA), solución Alsever (Dextrosa 20.05 g/L, Citrato de sodio.2H₂O 8 g/L, Ácido cítrico.H₂O 0.55g/L, NaCl 4.20 g/L), PBS y en el mismo plasma utilizado como control. Enseguida, se incubaron a 28°C por 20 min en cámara húmeda, se tomaron 100 μL de las suspensiones y se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma, USA), se adicionaron

10 μ L de Azul tripán al 0.01% en solución salina al 0.9%, se colocaron las muestras en cubreobjetos y se sellaron con barniz. Se observó en un microscopio invertido Olympus IMT-2 (Tokio, Japón) realizando conteos de 100 células en 5 diferentes campos visuales, se realizó el registro con una cámara digital Olympus E-300 (Tokio, Japón) acoplada al microscopio.

Adhesión Celular

Se tomaron 100 μ L de plasma obtenido previamente, se centrifugó a 280 x g a 4°C por 5 min, el botón celular se resuspendió en RPMI y se colocaron 100 μ L en un portaobjetos tratado con poli-L-lisina, delimitando los pozos con un marcador hidrofóbico ImmEdge Pen (Vector Laboratories, UK, H-4000), los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda a 28°C, posteriormente se adicionó azul tripán para determinar viabilidad y morfología en un microscopio invertido Olympus IMT-2 (Tokio, Japón).

Producción de anticuerpos policlonales

Se inmunizó un conejo hembra de la cepa Nueva Zelanda con 1 mg/Kg. de peso del animal con la lectina más Adyuvante Completo de Freund (Gibco Laboratories Inc., Grand Island, N.Y.); 1 parte de lectina (Ag) más una parte de ACF se realizaron cuatro inmunizaciones en intervalos de 15 días. Dos semanas después de la última inmunización, se sangró al conejo de la vena marginal de la oreja se obtuvieron 50 mL de sangre, se dejó coagular a 4°C separando el suero al que se le determinó el título del anticuerpo por el método de ELISA utilizando como sustrato CqL. Posteriormente, se purificaron los anticuerpos por precipitación con

solución saturada de sulfato de amonio; el material se centrifugó a 13, 200 x g por 30 min, el sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitado con agitación suave, se agregó lentamente sulfato de amonio saturado hasta una concentración final de 33 % de saturación, para asegurar la precipitación de los anticuerpos se mantuvo a 4 °C toda la noche. Se centrifugó el precipitado a 13, 200 x g por 30 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 10 mL de solución salina al 0.9 %. Se repitió dos veces más el proceso de precipitación y finalmente se resuspendió en dos mililitros de solución salina, se dializó exhaustivamente contra solución salina hasta la eliminación total del sulfato de amonio, el material dializado se centrifugó a 13, 200 x g para eliminar proteínas desnaturalizadas y finalmente en el sobrenadante se determinó concentración de proteínas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Inmunocitoquímica

Los hemocitos fueron lavados con RPMI y colocados en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-lisina y marcados con un lápiz hidrofóbico (Vector Labs.) se colocaron 1×10^5 células por pozo y se dejan incubar durante 30 min a 4°C en cámara húmeda, posteriormente fueron fijados con paraformaldehído al 4% en PBS por 15 min y se lavaron con Tritón X-100 al 0.2% (Sigma) en PBS, se bloqueó con BSA libre de IgG (Sigma) al 2% en PBS durante 20 min, posteriormente se lavaron las células con PBS y se incubaron con la concentración previamente estandarizada del anticuerpo anti-CqL 1:1000 durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las muestras con PBS e incubaron con conjugado de cabra anti-conejo- acoplado a Isotiocianato de

fluoresceína (FITC) 1:200 (Sigma) durante 60 min, al término de la incubación se hicieron lavados exhaustivos con PBS y PBS-Tween al 0.1%. Finalmente se montaron en antifotoblanqueador de la marca Vectashield (VECTOR Laboratories. Burlingame). Los hemocitos marcados fueron observados a 40 X en un microscopio Leica DM/SL (Weslar, GMBH) equipado con sistema de epi-iluminación, se utilizó una cámara Leica DFC/300FX (Crambridge, U.K.) con el programa Leica IM-1000 versión 1.20 release (Heerburg, Suiza).

Determinación de la generación de anión superóxido

Para el ensayo del estallido respiratorio se utilizaron monocapas de hemocitos en RPMI (5×10^5 células/pozo), las células se dejaron adherir en placas de 96 pozos con fondo plano (NUNC, Dinamarca) durante 10 minutos a 4°C , posteriormente fueron incubadas con 100 μL de NBT (0.2%, Sigma), en PBS, 2h a 37°C . A continuación, las placas se lavaron con PBS y metanol al 70%; se añadió 120 μL de KOH 2 M y se agitó lentamente durante una hora, posteriormente se agregaron 140 μL de dimetil sulfoxido (J.T. Baker) para solubilizar los depósitos de formazán, producidos por el O_2^- intracelular (Rook *et al.*, 1985). La coloración obtenida se determinó 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 el valor del coeficiente de extinción molar de NBTr de 0.1 DO a 630 nm y representa 1.9 nM de O_2^- (Rojas *et al.*, 2001). La influencia de CqL en el estallido respiratorio se determinó añadiendo la lectina en diferentes concentraciones a la monocapa de hemocitos (0.1 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Resultados

En este estudio fueron utilizados organismos adultos machos obtenidos del estanque “El Higuerón” en Jojutla, Morelos. Se utilizaron organismos en estado de intermuda, el cual fue determinado por el estado de desarrollo de los pleópodos. El peso promedio fue de $47.3 \text{ g} \pm 5.21$. Los organismos fueron mantenidos en estanques con las condiciones óptimas a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y una concentración de oxígeno disuelto de 4 mg/L ; la concentración promedio de proteínas totales en la hemolinfa, fue de $100 \pm 10 \text{ mg/mL}$.

Purificación de lectina.

La lectina del suero del langostino adulto *Cherax quadricarinatus* se purificó por cromatografía de afinidad. La fracción no retenida carecía de actividad aglutinante (Figura 1).

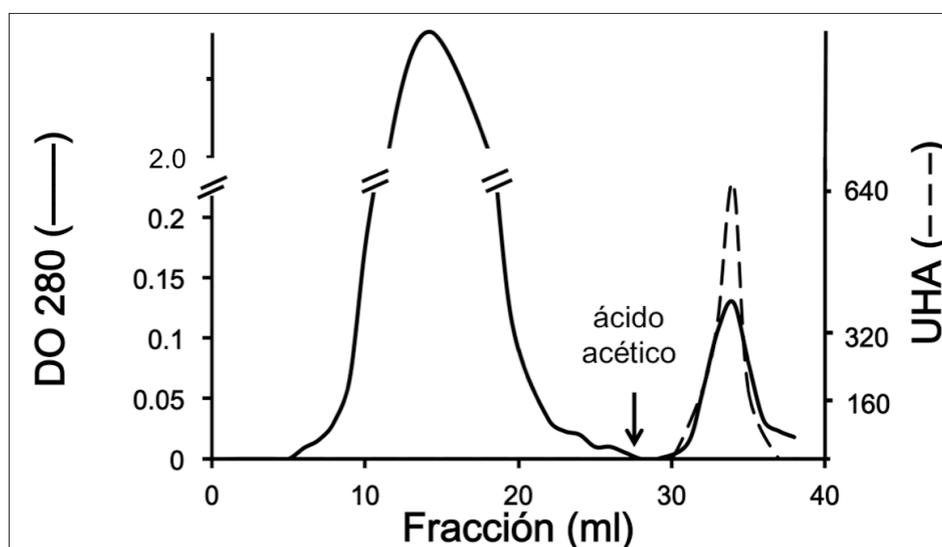


Figura 1. Perfil de elución de CqL por cromatografía de afinidad. La lectina fue eluída adicionando ácido acético al 3%. A cada fracción de 1 mL se le determinó absorbancia a 280 nm (—) y actividad hemaglutinante (- - -), reportada como el número de unidades hemaglutinantes (UHA), en presencia de eritrocitos de rata al 2 %; a las fracciones eluídas con ácido acético se ajustó el pH a 7 con NaOH 1M previo ensayo de aglutinación.

A partir de 100 mg de proteína total, se obtuvieron 0.7 mg de lectina. Se observó un incremento en la actividad específica cerca de 142 veces mayor entre el suero y la lectina purificada (Tabla 2).

Tabla 2. Purificación de la lectina sérica del langostino *Cherax quadricarinatus* por cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos de rata.

<i>Fracción</i>	<i>Concentración de proteínas (mg/mL)</i>	<i>UHA¹</i>	<i>Actividad específica²</i>
Suero	100	640	6.4
Fracción N.R.	70	0	0
CqL	0.7	640	914.3

¹UHA= Unidades hemaglutinantes en presencia de eritrocitos de rata al 2%.

²Actividad Específica =UHA/mg de proteína.

Peso molecular nativo

El peso molecular nativo de CqL purificada por cromatografía de afinidad fue determinado por cromatografía de filtración utilizando Sephacryl SH-300, este ensayo nos permitió determinar que la proteína tiene un peso molecular nativo aproximado de 290 kDa (figura 2).

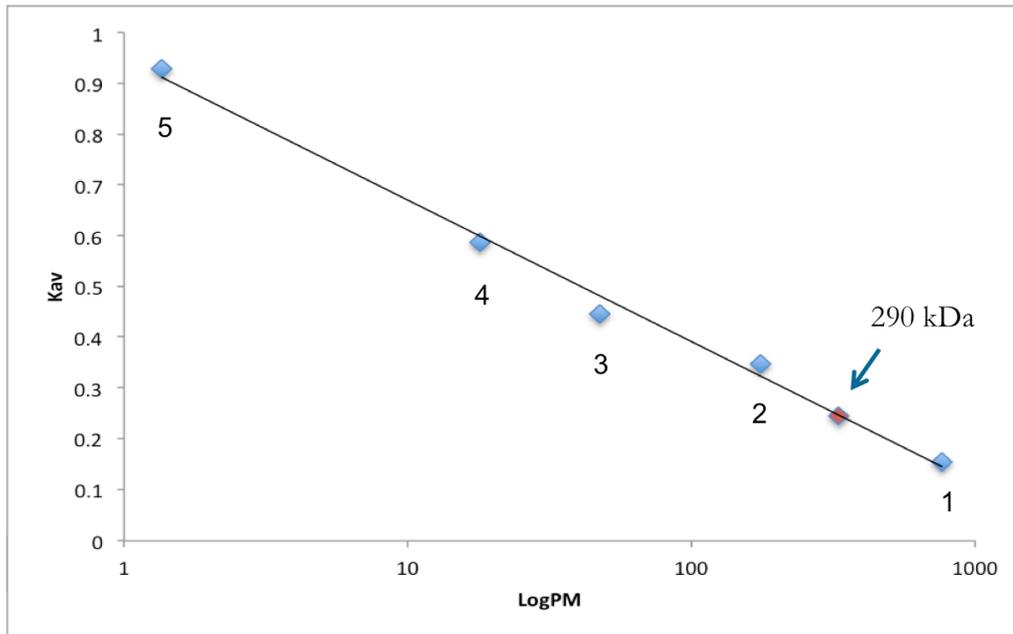


Figura 2.- Determinación del peso molecular nativo de la lectina CqL (♦) en condiciones no desnaturizantes por cromatografía por filtración en Gel. Los marcadores de peso molecular fueron: 1. Tiroglobulina bovina (670 kDa); 2. gamma-globulina bovina (158 kDa) 3. ovoalbúmina (44 kDa); 4. mioglobina (17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

Peso molecular de la lectina SDS PAGE

En el análisis electroforético bajo condiciones altamente desnaturizantes de la lectina (CqL) purificada, nos mostró que está constituida por 3 subunidades de 108 80 y 29 kDa aproximadamente (Figura 3).

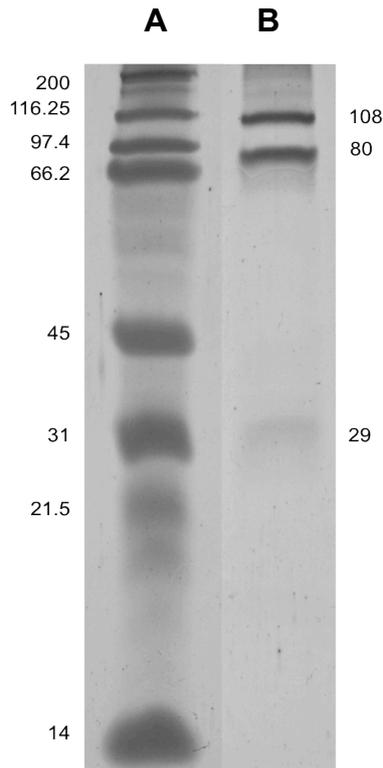


Figura 3. Perfil electroforético de la lectina CqL en SDS-PAGE con Urea. A) 20 µg de CqL purificada por cromatografía de afinidad. B) Marcadores de peso molecular: Miosina (200 kDa), β-galactosidasa de E. coli (116 kDa), β-fosforilasa de conejo (97.4kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica de bovino (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lisosima (14kDa).

Electroforesis en dos dimensiones

Se realizó el análisis en segunda dimensión de la CqL en un gradiente de pH de 3-10, se observaron isotipos de la proteína, en la unidad de 108 kDa se presentaron cuatro isoformas, en la de 80 kDa se localizaron ocho y en la banda de 29 kDa se encuentran tres isoformas, el punto isoeléctrico de CqL en un punto medio se calculó en 7.0 (figura 4).

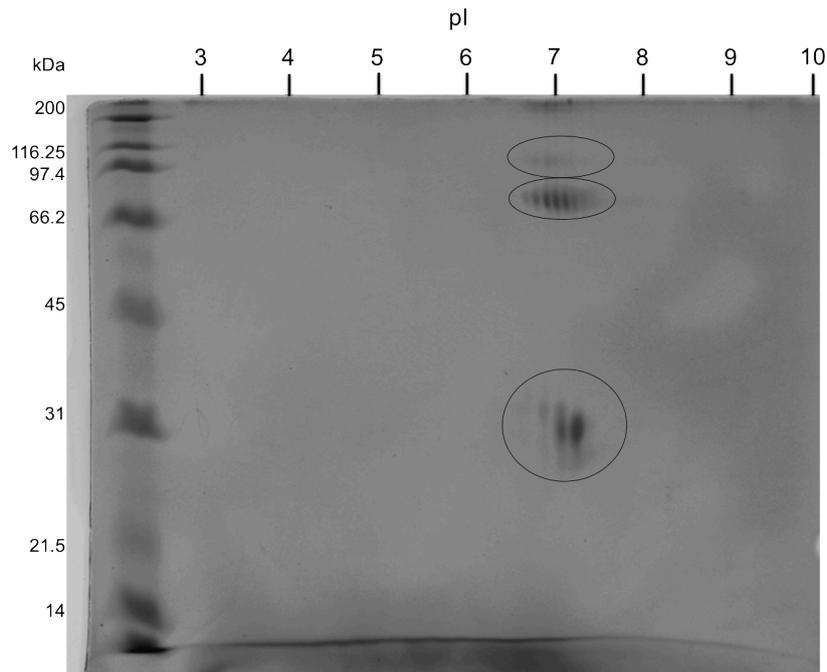


Figura 4. Electroforesis en dos dimensiones de CqL. Marcadores de peso molecular: Miosina (200 kDa), β -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), β -fosforilasa de conejo (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica de bovino (31 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa) y lizosima (14kDa).

Análisis proteómico

Se llevó a cabo la comparación de los péptidos generados a partir de CqL con las bases de datos de NCBI, no presentó homología con ninguna secuencia de aminoácidos reportada hasta el momento del análisis.

Análisis de la composición de azúcares

Se llevo acabo el procedimiento para determinar la composición de carbohidratos presentes en CqL. No se presentaron azúcares en la composición de la lectina sérica de *Cherax quadricarinatus*.

Análisis de composición de aminoácidos.

La CqL presentó poca variación en la composición de aminoácidos entre las tres subunidades: 46.3% corresponde a aminoácidos no polares, 20.4% a aminoácidos con carga negativa, 16.6% a aminoácidos con grupos polares, 10.7 % aminoácidos con cargas positivas y 6% con grupos aromáticos; los aminoácidos más abundantes son glicina, ácido glutámico y alanina y los que están presentes en menor cantidad son fenilalanina, histidina y metionina.

Tabla 3. Composición de aminoácidos en las subunidades de CqL.

Aminoácidos	Subunidad		
	A (%)	B(%)	C (%)
Gly	15.3	22.5	15.3
Glu	13.4	9.8	14.7
Ala	10.3	15.3	9.0
Ser	9.8	11.3	10.5
Asp	7.6	6.4	9.2
Thr	6.7	5.5	6.0
Leu	6.9	4.9	5.4
Lys	4.2	3.8	5.3
Arg	4.3	3.3	5.5
Val	4.9	3.8	4.0
Ile	4.5	2.8	2.7
Tyr	2.6	3.8	3.3
Pro	3.7	2.5	3.2
Phe	3.2	2.3	2.8
His	1.8	1.5	2.3
Met	0.8	0.6	0.8

A) Subunidad de 108 kDa. B) Subunidad de 80 kDa y C) Subunidad de 29 kDa.

Actividad Hemaglutinante.

El suero aglutinó preferentemente eritrocitos de conejo y rata ambos con UHA de 640, presentó una disminución del 75% en el reconocimiento por el eritrocitos de ratón y un 87.5% menos por los eritrocitos de humano A, O y cuyo. No presentó ningún reconocimiento por los eritrocitos de humano B y hámster. Al tratar los eritrocitos con sialidasa y tripsina aumento su reconocimiento respecto a los eritrocitos nativos (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad hemaglutinante de la lectina de *Cherax quadricarinatus* con diferentes tipos de eritrocitos.

Eritrocitos	Unidades hemaglutinantes (UHA)		
	Nativos	Tratados con sialidasa	Tratados con tripsina
Conejo	640	2,560	10,240
Rata	640	1,280	2,560
Cuyo	80	80	80
Hámster	0	80	160
Ratón	160	160	160
Humano A	80	80	80
Humano B	0	0	80
Humano O	80	80	80

*UHA = Unidades hemaglutinantes en presencia de eritrocitos de rata al 2%.

Especificidad por carbohidratos y glicoproteínas.

La especificidad de la lectina por carbohidratos y glicoproteínas fue determinada mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación, manteniendo constante la actividad de lectina, considerando un título de 1:4 en presencia de eritrocitos de rata al 2%. El carbohidrato que mejor inhibió fue NeuAc, presentó 66 veces mas potencia relativa inhibitoria que la GlcNH₂. La MSB fue la glicoproteína que presentó mejor capacidad inhibitoria, 12.5 veces más que la MEP y 30 veces mas que la Fetuina (tabla 4).

Tabla 5. Especificidad de CqL por carbohidratos y glicoproteínas

Inhibidor	Concentración (mM)¹	Potencia relativa inhibitoria ²
GlcNH₂	100	1
GalNH₂	50	2
GalNAc	50	2
GlcNAc	50	2
Fuc	25	4
Glc	6.25	16
MαDGal	6.25	16
Gal	3.2	31.3
NeuAc	1.5	66.7
FET	.012	8,333
MEP	.006	20,000
MSB	.0004	250,000

¹Concentración mínima para inhibir 4 UHA. ²Valor comparativo de la concentración de inhibidores/GlcNH₂. Otros azúcares/glicoproteínas sin actividad inhibitoria a 200 mM fueron: manosa, metil α-D-manopiranososa, albumina sérica bovina, manosamina.

Efecto de cationes divalentes en la actividad aglutinante de CqL.

La lectina de *Ch. quadricarinatus* presentó diferencia en la actividad específica en presencia de diferentes cationes, a una concentración de 2 mM; el MnCl_2 presentó 8 veces mayor cantidad de UHA respecto al CaCl_2 , utilizando 5mM de ambos cationes se tuvo la misma actividad. MgCl_2 no presentó ningún efecto en la actividad aglutinante (Figura 5).

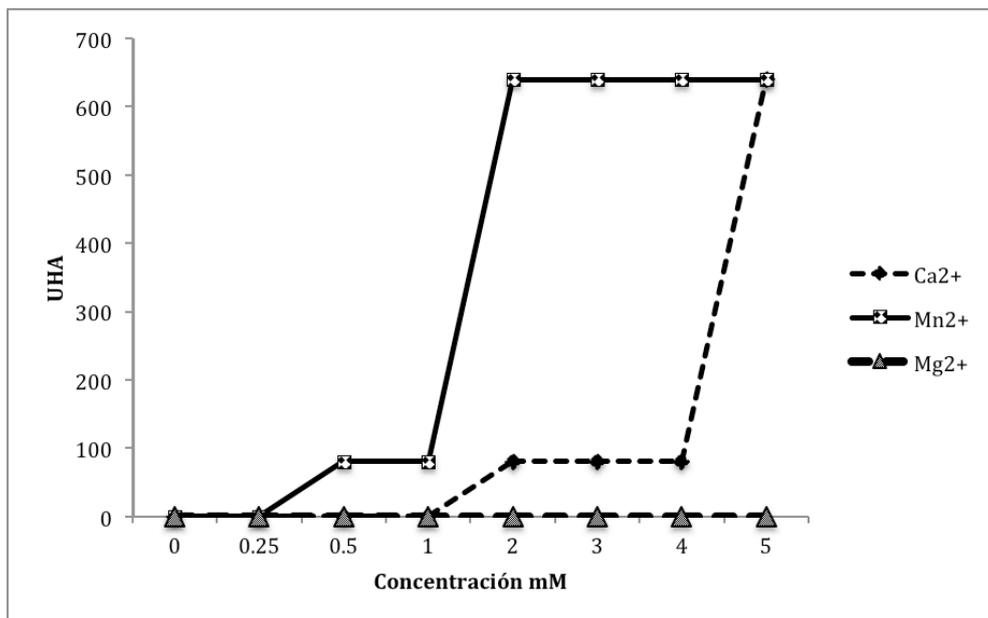


Figura 5. -Efecto de cationes en la actividad aglutinante de CqL. CaCl_2 (◆), MgCl_2 (▲) o MnCl_2 (■) en presencia de eritrocitos de rata al 2% en solución salina.

Inmunocitoquímica

La presencia de CqL en hemocitos se determinó utilizando anticuerpos policlonales anti-CqL y revelados por medio del conjugado de cabra anti-conejo acoplado a FITC. Se observa que CqL se encuentra en membrana y gránulos de los hemocitos (Figura 6).

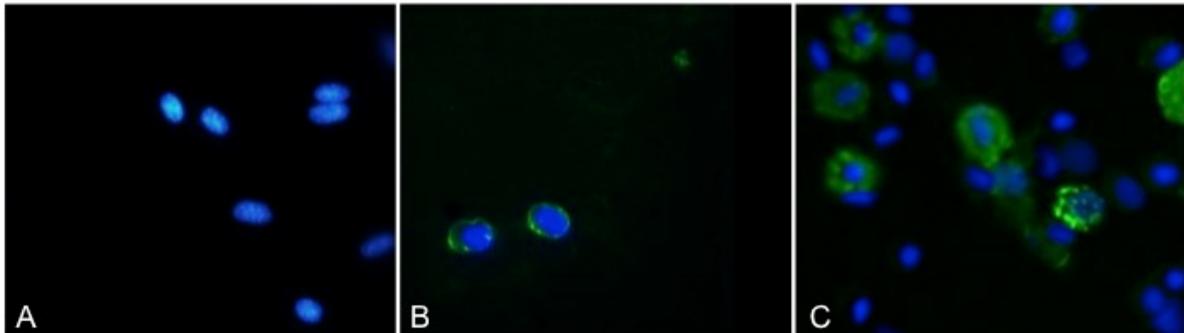


Figura 6. Microscopia de fluorescencia de hemocitos de *Cherax quadricarinatus* marcados con anti-CqL y revelados con conjugado de anticuerpo cabra anti-conejo acoplado a FITC. A) Control negativo 100x. B) Marcaje positivo de color verde en membrana celular anti-CqL 100x. C) Marcaje positivo de color verde en gránulos citoplasmáticos anti-CqL 100x.

Generación de anión superóxido.

Se utilizaron monocapas de 1×10^5 hemocitos para determinar la producción del anión superóxido mediante la reducción de NBT. Se observó un aumento de 1.5 veces en la presencia de CqL en la producción de especies reactivas del oxígeno sin embargo, este efecto se inhibe mediante la adición de SOD (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de CqL en la producción de anión superóxido en los hemocitos de *Cherax quadricarinatus*.

Estimulación	Concentración	nMNBT _r
Control	Solo NBT	2.52
Zymozan	1 mg/mL	6.32 **
CqL	5 µg/mL	4.47 **
SOD	0.1 mU	1.90 **
CqL / SOD	5 µg/mL/0.1 mU	2.00 *
PMA	7.5 ηg	4.71 **

Monocapa de hemocitos (1×10^5) incubados con activadores 60 min antes de añadir NBT. CqL: Lectina de *Cherax quadricarinatus*. PMA: forbol 12-miristato 13-acetato, SOD: Superóxido dismutasa. Diferencias significativas con valores de * $p < 0.05$ y ** $p < 0.025$ determinados por la prueba U de Mann-Whitney, comparado con el control (NBT solo).

Se realizó la determinación del estallido respiratorio en presencia de azúcares y la CqL. Se observó que los carbohidratos Gal y Glc inhibieron la producción de estos aniones en un 92% y un 84% respectivamente comparada con el control positivo (CqL / NBT) (Tabla 7).

Tabla 7. Especificidad de la lectina de *Cherax quadricarinatus* por diferentes carbohidratos y su producción de anión superóxido.

Estimulación	Inhibición	nMNBT _r
CqL	-	4.47
CqL /Gal	94%	2.64**
CqL / Glc	82%	2.87**
CqL / Man	3%	4.42

La CqL es incubada durante 20 minutos con cada carbohidrato (100mM) a temperatura ambiente. Monocapa de hemocitos (1×10^5) incubados con activadores 60 min antes de añadir NBT. PMA: forbol 12-miristato 13-acetato, SOD: Superoxido dismutasa. Gal: galactosa. Glc: Glucosa Man: Manosa. Diferencias significativas con valores de ** $p < 0.025$ determinados por la prueba U de Mann-Whitney, comparado con el control (CqL / NBT).

Discusión

Los crustáceos son un grupo de gran interés comercial, que constituyen material de investigación por su alta importancia económica; la pesca intensiva y la acuicultura son las principales actividades que se llevan a cabo con este grupo de invertebrados. En los últimos años se han realizado gran cantidad de trabajos en crustáceos, particularmente en camarones, sobre los mecanismos de defensa, centrándose en patrones de reconocimiento a patógenos mediante compuestos séricos y la actividad celular en relación a diferentes antígenos, con el propósito de que a futuro pudiera aplicarse al diagnóstico del estado de salud de estos organismos (Cerenius *et al.*, 2010). En crustáceos se han descrito algunas moléculas presentes en la hemolinfa que participan en los mecanismos de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) dentro de ellos, el grupo de las lectinas, son las principales moléculas estudiadas.

En el presente trabajo se realizó el aislamiento y caracterización de una lectina sérica del langostino *Cherax quadricarinatus* (CqL) proveniente de organismos machos adultos en fase de intermuda, el peso molecular nativo que presentó la lectina fue de aproximadamente 290 kDa, compuesta por tres subunidades de 29, 80 y 108 kDa respectivamente. Se han caracterizado lectinas de langostinos dulceacuícolas con gran variedad en el peso molecular nativo así como en el tamaño y número de subunidades; la lectina del langostino *M. rosenbergii* está conformada por una subunidad de 9.6 kDa y un peso nativo de aproximadamente 20 kDa (Vázquez *et al.*, 1993) y la lectina de *Pacifastacus leniusculus* presenta

una subunidad de 75 kDa (Kopáček *et al.*, 1993). La lectina sérica de la langosta *Macrobrachium americanum* está compuesta por tres subunidades de 87, 66 y 42 kDa (Pereyra *et al.*, 2012). Las lectinas de crustáceos decápodos dulceacuícolas están compuestas principalmente por una subunidad, esto datos demuestran que CqL presenta una notable heterogeneidad en la estructura de las lectinas dentro de este grupo.

Dentro de las investigaciones realizadas en invertebrados se encuentran algunos trabajos que reportan la presencia de varias lectinas séricas con diferentes características bioquímicas así como diversas funciones fisiológicas (Viswambari *et al.*, 2010). Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se realizó la caracterización de una sola lectina (CqL) con el fin de determinar sus propiedades bioquímicas específicas y su participación en los mecanismos de defensa del langostino.

La CqL carece de carbohidratos en su composición, dato poco frecuente en crustáceos decápodos, ya que generalmente las lectinas de estos organismos son glicoproteínas (Rittidach *et al.*, 2007; Alpuche *et al.*, 2005), otra lectina sin carbohidratos en su estructura es la de *Macrobrachium americanum* (Pereyra *et al.*, 2012). La composición de aminoácidos de CqL está conformada fundamentalmente por aminoácidos hidrofóbicos (46.3%) y aminoácidos con carga negativa (20.4%), la presencia de estos aminoácidos favorece una estructura secundaria de tipo α -hélice. La lectina sérica del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* presenta una similitud notable entre las proporciones de los grupos de

aminoácidos con respecto a CqL, el grupo mas grande es el no polar y el de menor tamaño es el hidrofílico, (Vázquez *et al.*, 1993).

La CqL presentó diferentes isoformas en sus tres subunidades, una característica común en las tres subunidades es el pI que se encontró en el rango de 6.5 a 7.5, en la subunidad de 108 kDa presentó 5 isoformas, la de 80 kDa 9 isoformas y la de 29 kDa 3 isoformas. Se ha reportado la presencia de isoformas en otros crustáceos decápodos como lo es en *M. rosenbergii* que tienen valores de pI de 4 a 6.1 (Zenteno *et al.*, 2000). Hasta el momento no se han esclarecido por completo las causas de la presencia de isoformas de lectinas en crustáceos, sin embargo es probable que la identificación de familias multigénicas asociadas a lectinas en otros invertebrados pudieran estar relacionadas con la variabilidad de isoformas que se sintetizarían por rearrreglos polimórficos (Theopold *et al.*, 1999; Schulenburg *et al.*, 2008). La presencia de estas isoformas podría generar una diversidad en el reconocimiento a carbohidratos (Zenteno *et al.*, 2000), podrían participar activamente en la activación de diferentes mecanismos de inmunidad como la inducción del sistema de la profenoloxidasa y en un aumento de la actividad microbicida (Wang *et al.*, 2012).

Se realizó un análisis de espectrometría de masas para determinar la secuencia de aminoácidos, no se obtuvieron resultados significativos que sugirieran una homología con las bases de datos existentes en la red, esto nos indica que la estructura de esta proteína no contiene secuencias de aminoácidos reportados hasta el momento. Las lectinas tipo C se caracterizan por mantener un DRC constante pero una composición de aminoácidos muy variable (Dickhamer, 1999;

Vasta *et al.*, 2007). Las lectinas de invertebrados muestran baja homología en las secuencias, menos del 40% entre organismos filogenéticamente cercanos (Matsubara *et al.*, 2007), incluso lectinas del mismo organismo presenta baja similitud (Song *et al.*, 2010).

Para determinar la especificidad de CqL se realizaron inhibiciones de la actividad hemaglutinante con diferentes monosacáridos, la lectina sérica de *Ch. quadricarinatus* presentó un alto reconocimiento a glucosa, galactosa y ácido siálico, bajo por GlcNH₂, GalNH₂ y ninguna afinidad por Man o metil α -D-Manosa. Al realizar un análisis sobre la estructura de los monosacáridos y las posiciones de los grupos presentes en los carbonos de cada estructura, se observa que la galactosa y la glucosa comparten el grupo OH en posición axial del C2; por su parte la GlcNH₂ y GalNH₂ presentan un grupo amino en la posición C2 y la Manosa tiene el grupo hidroxilo en otra posición. Podemos sugerir que la posición del grupo OH en C2 juega un papel importante en la interacción de la lectina con los monosacáridos. Por otra parte, la galactosa y la glucosa presentan la misma posición de los grupos OH en los C1, C2, C3 y C6, siendo esta la probable razón de que los dos carbohidratos presenten gran similitud en la afinidad.

Estos dos carbohidratos se encuentran presentes en altas concentraciones dentro de las estructuras sacarídicas presentes en las bacterias de tipo Gram negativas (Cox *et al.*, 1997) y en el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Wei *et al.*, 2012). Se han realizado trabajos sobre la regulación de lectinas de tipo C del langostino *M. rosenbergii* en presencia de patógenos como *Vibrio anguillarum* y

WSSV (Ren *et al.*, 2012), así mismo se ha reportado un aumento de las lectinas presentes en la hemolinfa de *M. sexta* una vez que se ha expuesto a un estímulo (Yu *et al.*, 1999). Estos resultados nos permiten sugerir que la especificidad que presenta CqL por Gal y Glc puede presentar un importante función en el reconocimiento y su regulación en presencia de este tipo de patógenos.

En la mayoría de los crustáceos dulceacuícolas se reporta el reconocimiento hacia NeuAc como en el langostino *M. rosenbergii* (Vazquez *et al.*, 1993) y en los cangrejos *L. depurator* (Fragkiadakis., 1997) y *P. jacquemontii* (Denis *et al.*, 2003). En trabajos recientes, principalmente en camarones, se ha descrito la presencia de dos dominios de reconocimiento a carbohidratos diferentes, el reconocimiento hacia Gal y Glc se ha reportado principalmente en crustáceos marinos, entre los cuales se encuentran las lectinas del camarón *F. merguensis* (Rattanaorn y Utarabhand 2011) y de *L. vannamei* (Ma *et al.*, 2007), en la lectina purificada del camarón *P. monodon* reconoce Gal y NeuAc principalmente (Luo *et al.*, 2006). Esta información nos permite sugerir que la CqL presente dos DRC específicos, de tal manera que sería la primera lectina de crustáceo decápodo dulceacuícola con reconocimiento hacia NeuAc y Gal hasta el momento.

CqL reconoce preferentemente eritrocitos de rata y de conejo, las membranas celulares de estas especies en su contenido total de azúcares tienen entre 25 - 30% de de azúcares derivados de 9-O-acetil ácido siálico (Neu5,9Ac), la hemolinfa y la lectina purificada de *Ch. quadricarinatus* presentó un reconocimiento por el monosacáridos Neu5Ac, probablemente el reconocimiento es en el grupo O-Acetil de C5 del ácido siálico. Al tratar a los eritrocitos con tripsina se observó un

incremento con respecto a los títulos de hemaglutinación en eritrocitos no tratados, la tripsina remueve las estructuras proteicas en la membrana celular, esto nos permite sugerir que la afinidad por los glicolípidos en los eritrocitos es mayor que por las glicoproteínas.

Para confirmar la especificidad de la CqL se utilizaron diferentes proteínas con diferentes tipos de carbohidratos en su composición: la fetuina, la mucina submaxilar bovina y la mucina estomacal porcina; estas proteínas inhiben la actividad hemaglutinante de la CqL, resultado consecuente con las altas concentraciones de residuos de ácido siálico O-acetilados en su estructura. La MSB presenta una alta concentración de estructuras con presencia de un grupo O-acetil en la posición 4, 7, 8 y 9, puede presentar de uno a tres grupos acetilos en la estructura del ácido siálico (Vandamme-Feldhaus y Schauer., 1998). La fetuina presenta ácido siálico con un grupo O-acetil en el carbono 5 (C-5) en la posición final de las cadenas laterales de los oligosacáridos (Nilsson *et al.*, 1979), la mucina estomacal porcina presenta una concentración alta de O-glicanos (71-76%), y una baja de NeuAc en su composición de carbohidratos, sin embargo presenta alto contenido de Gal y Fuc en posiciones terminales de las ramificaciones sacarídicas (Karlsson *et al.*, 1997), estos azúcares serían los responsables del reconocimiento por la CqL, pues ambos carbohidratos inhiben la actividad de la lectina como se demuestra en los resultados de hemaglutinación y de la explosión oxidativa. Como es el caso de la mayoría de otros crustáceos reportados como en el langostino *M. rosenbergii* se observó el reconocimiento a estructuras derivadas del ácido

neuroamínico (Vázquez *et al.*, 1993), en los cangrejos de agua dulce *L. depurator* (Fragkiadakis., 1997) y *P. jacquemontii* (Denis *et al.*, 2003) se reportó reconocimiento a derivados de NeuAc y glicoproteínas con residuos de ácido siálico en su estructura.

La CqL presentó actividad en presencia de los cationes divalentes Ca^{2+} y Mn^{2+} , la ausencia de estos compuestos reduce significativamente la actividad de la lectina, lo que sugiere que la presencia de cationes es necesaria para el correcto enlace generado entre la lectina y carbohidrato así como para mantener el correcto plegamiento de la estructura terciara de la lectina para el reconocimiento. Otras lectinas presentes en crustáceos de agua dulce, como la lectina de *P. potamios* ó MrL mejoran su actividad en presencia de Calcio (Fragkiadakis *et al.*, 2000; Vázquez *et al.*, 1993), por el contrario, varias especies como el langostino blanco de la india *P. indicus* no presentan variación en su función en presencia de cationes divalentes (Jayasree., 2001). Estos datos muestran una variedad en la dependencia de cationes divalentes dentro del grupo de los crustáceos decápodos reportados hasta el momento.

Por inmunocitoquímica se determinó la presencia de lectina en los hemocitos del langostino. Los resultados muestran la presencia de CqL en gránulos citoplasmáticos así como en membrana plasmática; en estudios recientes en crustáceos decápodos se ha demostrado que la distribución de las lectinas de tipo C se encuentra en los mismos sitios señalados en este reporte (Alpuche *et al.*, 2009). Estos resultados nos permiten proponer que la lectina que se encuentra en

membrana celular de los hemocitos podría participar en el reconocimiento de estructuras sacarídicas asociadas a agentes patógenos.

Se realizaron ensayos de producción de anión superóxido en una monocapa de hemocitos en presencia de CqL, la generación de O_2^- se vio incrementada 1.5 veces en presencia de 5 μ g de CqL con respecto a la actividad basal sin lectina. Para confirmar la especificidad de la lectina sérica se inhibió con los carbohidratos con los que presentó mayor afinidad, posteriormente, se determinó la producción de anión superóxido. Se observó una disminución en la producción de O_2^- en presencia de azúcares que presentaban inhibición en las pruebas de aglutinación. Este resultado corrobora la especificidad de los azúcares y la participación de la lectina en el estallido respiratorio. En el camarón *L. setiferus* (Alpuche *et al.*, 2009) y en langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (Sierra *et al.*, 2005) se demostró la participación de las lectinas séricas en la producción de anión superóxido. También se ha reportado que las lectinas séricas tipo C purificadas en otros crustáceos decápodos reconocen algunas cepas de bacterias y virus potencialmente patógenos para los organismos (Vázquez *et al.*, 1996; Song *et al.*, 2010), lo que sugiere que la lectina sérica de *Ch. quadricarinatus* participa activamente en el mecanismo de fagocitosis induciendo la producción de radicales libres con el propósito de ayudar a la eliminación de patógenos del organismo.

En este trabajo se purificó y caracterizó una lectina sérica en el langostino *Cherax quadricarinatus* así como se determinó su participación en el proceso de la fagocitosis, es indispensable continuar realizando estudios sobre los mecanismos

de defensa en crustáceos y aportar mayor información para entender las modificaciones fisiológicas que se presentan en el organismo cuando se encuentran en presencia de patógenos (Pascual *et al.*, 2012). Tratar de dilucidar en que mecanismos de defensa participa CqL de manera directa y determinar que tipo de agentes patógenos son reconocidos mediante esta lectina, esto con la finalidad de aportar información que lleve a tener un impacto positivo sobre los cultivos emergentes de *Cherax quadricarinatus*

Conclusiones

- CqL esta compuesta de tres subunidades, característica que no se presenta frecuentemente entre los crustáceos decápodos.
- La lectina de *Cherax quadricarinatus* está compuesta mayormente por aminoácidos hidrofóbicos.
- Esta lectina es inhibida principalmente por NeuAc y Gal, característica que comparte con algunos crustáceos principalmente marinos.
- CqL es una proteína heterotrimérica, ya que presenta isoformas en las subunidades de las que está compuesta.
- Esta lectina no es glicoproteína.
- Nuestros datos sugieren que la lectina sérica de *Cherax quadricarinatus* participa en la producción de la molécula de anión superóxido.

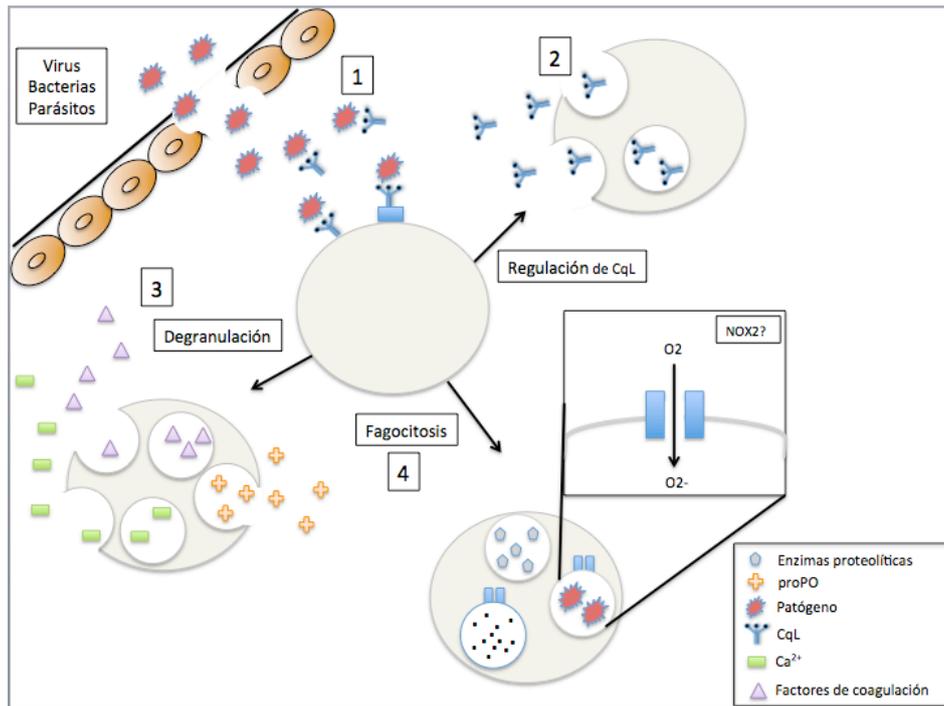


Figura 7. Mecanismos de defensa relacionados con lectinas séricas en crustáceos. Opsonización y actividad antiviral (1); Regulación de las lectinas (2); Activación del sistema de la profenoloxidasas y de la coagulación (3); enzimas proteolíticas (4).

Perspectivas

- Aislamiento de las isoformas de CqL
- Identificar el receptor de membrana de CqL en los hemocitos.
- Caracterizar bioquímicamente el receptor de la lectina de *Cherax quadricarinatus*.
- Buscar las vías de activación de la lectina en los hemocitos de *Cherax quadricarinatus*.
- Determinar la secuencia de aminoácidos de CqL.
- Identificar el reconocimiento de especies patógenas relacionadas con este organismo.

Referencias

- Alpuche, J., Pereyra, A., Agundis, C., Rosas, C., Pascual, C., Slomianny M. C., Vazquez, L., Zenteno, E., (2005), Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta* 2005. 1724: 86 – 93.
- 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.
- Battison, A., Summerfield, R. (2009). Isolation and partial characterization of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus*. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 198 – 204.
- Bildlingmeyer, B.A., Warren, F.V. (1994) *Anal Chem.* 56: 1583 – 1596.
- Bollag, M., Rozycki, M., Edelstein, J. (1991). Protein extraction in *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York.
- Cerenius, L., Jiravanichpaisal, P., Liu, H., Söderhäll, I., Capítulo 13: Crustacean Immunity En: Söderhäll, K., (2010) *Invertebrate immunity*. Springer Science+Business Media, LLC. Landes Bioscience.

- CONAPESCA. (2009). Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2009.
- Cortés, E., Villareal, H., Civera, R., Martínez, R. (2003) Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae).
- Cox, A., Brisson, J., Thibault, P., Perry, M., (1997). Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* serotype O22. Carbohydrat. Res. 304:191 – 208.
- Denis, M., Palatty, P., Bai, N., Suriya, S. (2003) Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. Eur. J. Biochem. 270: 4348 – 55.
- Doeller, J., Kraus, D., Watts, S., (2002) Effects of temperature and salinity on weight gain, oxygen consumption rate, and growth efficiency in juvenile Red claw Crayfish *Cherax quadricarinatus*. J. World Aquacult. Soc. 33: 188 – 198.
- Drickamer, K. (1999) C-type lectin-like domains. Curr. Opin. Struct. Biol. 9(5): 585 – 590.
- Dubois, M. K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: 350 - 356.

- Fragkiadakis, G., Stratakis, E. (1997) The lectin from the crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetylsialic acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 117: 545 – 552.
- Fragkiadakis, G. (2000). Isolation of lectins from hemolymph of decapod crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 44: 109 – 114.
- Goimier, Y., Pascual, C., Sánchez, A., Gaxiola, G., Sánchez, A., Rosas, C. (2006) Relation between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (*Crustacea; Penaeidae*). *Anim. Reprod. Sci.* 92: 193 – 208.
- Iwanaga, S., Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 128 – 150.
- Jayasree, S. (2001) Biological properties of a natural agglutinin in the hemolymph of Indian white prawn, *Penaeus indicus*. *H. Milne Edwards. Aqua* 194: 245 – 252.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B., Söderhäll, K. (2006) Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213 - 216.
- Karlsson, N.G., Nordman, H., Karlsson, H., Carlstedt, I., Hansson, G.C. (1997) Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. *Biochem. J.* 326: 911 – 917.

- Kopáček, P., Grubhoffer, L., Söderhäll, K. (1993) Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Dev. Comp. Immunol. 17: 440 - 418.
- Lanz, H., Tsutsumi, V., Aréchiga, H., (1993) Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarki* blood cells. Dev. Comp. immunol. 17: 389 – 397.
- Lin, X., Söderhäll, I. (2011) Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. Blood J. 117: 6417 - 6424.
- Ling, E., Yu, X. (2006) Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Dev. Com. Immunol. 30: 289 - 299.
- Luo, T., Yang, H.J., Li, F., Zhang, X.B., Xu, X., (2006) Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. Dev. Comp. Immunol. 30: 607 – 617.
- Ma, T., Tiu, S., He, J., Chan, S. (2007) Molecular cloning of a C-type lectin (LvLT) from the shrimp *Litopenaeus vannamei*: early gene down-regulation after WSSV infection Fish. Shellfish. Immunol. 23: 430 – 437.
- Marques, M.R.F., Barracco, M.A. (2000). Lectins as non-self recognition factors, in crustaceans. Aquaculture. 191: 23 – 44.

- Matsubara, H., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Jimbo, M., Kamiya, H., Ogawa, T., Muramoto, K. (2007) Diverse sugar-binding specificities of marine invertebrate C-type lectins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 513 - 519.
- Nilsson, B., Norden, N., Svensson, S. (1979) Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. *J. Biol. Chem.* 254: 4545 – 4553.
- Pascual, C., Zenteno, E., Cuzon, G., Sánchez, A., Gaxiola, G., Taboada, G., Suárez, J., Maldonado, T., Rosas, C. (2004) *Litopenaeus vannamei* juveniles energetic balance and immunological response to dietary protein. *Aquaculture* 236: 431 – 450.
- Pascual, C., Huchin-Mian, J.P., Simões, N., Briones-Fourzán, P., Lozano-Álvarez, E., Sánchez, A., Pérez-Vega, J., Simá-Álvarez, R., Rosas, C., Rodríguez-Canul, R. (2012) Physiological and immunological characterization of Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* naturally infected with *Panulirus argus* Virus 1 (PaV1). *Dis. Aquat. Org.* 100: 133 - 124.
- Peebles, J. (1977) A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosebergii*. *Aquaculture* 12: 173 - 180.
- Pereyra, A., Alpuche, J., Sainz J.C., Zenteno, E., Agundis, C. (2012) Purification and parcial characterization of a lectin from the prawn *Machrobrachium americanum* (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 85: 1253 - 1267.

- Rattanaporn, O., Utarabhand, P. (2011) Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis*: Early gene up-regulation after *Vibrio harveyi* infection. J. Invertebr. Pathol. 106: 196 - 204.
- Ren, Q., Meng, L., Du, Jie., Zhang, C., Wang, W. (2012) Immune response of four dual-CDR C-type lectins to microbial challenges in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish Shellfish Immunol. 33(2): 155 – 167.
- Rittidach, W., Paijit, N., Utarabhand, P. (2007) Purification and characterization of a lectin from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguensis* hemolymph. Biochim. Biophys. Acta. 1770: 106 – 114.
- 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 – 345.
- 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: 161–167.
- Sahoo, P., Pillai, B.R., Mohanty, J., Kumari, J., Mohanty, S., Mishra, B.K. (2007) Differential affinity of the natural haemagglutinin of *Macrobrachium*

rosenbergii towards vertebrate erythrocytes: effect of sex, size and moult stage on haemagglutination titre. *Indian J. Exp. Biol.* 45: 1–5.

- Schulenburg, H., Hoepfner, M., Weiner III, J., Bornberg-Bauer, E. (2008) Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLN) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology*. 213: 237-250.
- 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.
- Smith, V. (2010) Immunology of Invertebrates: Cellular. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Song, K. K., Li, D. F., Zhang, M. C., Yang, H. J., Ruan L. W., Xu, X. (2010) Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 28: 596 – 603.
- Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M., Jiang, K., Tao, R., Zhang, G. (2008) Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 25: 290 - 297.
- Theopold, U., Rissler, M., Fabbri, M., Schmidt, O., Natori, S. (1999) Insect glycobiology: A lectin multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 923 - 927.

- Vandamme-Feldhaus, V., Schauer, R. (1998) Characterization of the enzymatic 7-O-acetylation of sialic acids and evidence for enzymatic O-acetyl migration from C-7 to C-9 in bovine submandibular gland. *J. Biochem.* 124: 111-12.
- 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.
- Vasta, G.R., Ahmed H, Tasumi S, Odom E, Saito K. (2007). Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. *Adv Exp Med Biol.* 598: 389–406.
- Vázquez, L., Masso, F., Rosas, P., Montano, L.F., Zenteno, E. (1993) Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 617–623.
- Vázquez, L., Jaramillo, L., Lascrain, R., Cooper, E. L., Rosas, P., Zenteno, E. (1996) Bacterial Agglutination by the Sialic Acid Specific Serum Lectin From *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 355 - 359.
- Vázquez, L., Maldonado, G., Agundis, C., Pérez, A., Cooper, E. L., Zenteno E. (1997) 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.

- Vázquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E. (2009) Review: Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*. 15: 179 – 188.
- Villarreal, J., Naranjo, J. (2008) Cultivo de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus*. Una oportunidad para la diversificación de la industria acuicola. CIBNOR, S.C. Pp 2.
- Viswambari, R., Basilrose, M., Mercy, P. (2010) Prospects for lectins in arthropods. *Ital. J. Zool.* 77: 254 – 260.
- Wang, X.W., Zhang, X.W., Xu, X.T., Zhao, X.F., Wang, J.X. (2009) A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo Chinese white shrimp. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 1039 – 1047.
- Wang, X., Zhang, H-W., Li, X., Zhao F-X., Wang, J-X. (2011) Characterization of a C-type lectin (PcLec2) as an upstream detector in the prophenoloxidase activating system of red swamp crayfish. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 241 – 247.
- Wang, X., Wang, J. (2012) Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 39: 27 – 38.
- Wei, X., Liu, X., Yang, J., Fang, J., Qiao, H., Zhang, Y., Yang, J. (2012) Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish Shellfish Immunol.* 32: 132 – 140.

- Yu, X., Gan, H., Kanost, M. (1999) Immunolectin, as inducible C-type lectin from insect, *Manduca sexta*, stimulates activation of plasma prophenol oxidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 585 – 597.
- Zanetta, J.P., Pons, A., Iwersen, M., Mariller, C., Leroy, Y., Timmerman, P., Schauer, R. (2001) Diversity of sialic acids revealed using gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycobiology*, 11(8): 663 – 676.
- Zänker, K., (2010) Immunology of Invertebrates: Humoral. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Zenteno, R., Vazquez, L., Martínez-Cairo, S., Bouquelet, S., Agundis, C., Zenteno, E. (2000) Identification of lectin isoforms in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879). *Glycocon. J.* 17: 339-347.
- Zhang, X.W., Wang, X.W., Sun, C., Zhao, X.F., Wang, J.X. (2011) C-type lectin from red swamp crayfish *Procambarus clarkii* participates in cellular immune response. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 76: 168 – 184.

ANEXOS