



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

CONCENTRACIÓN DE LECTINA EN LA  
HEMOLINFA DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus*  
*vannamei*) EXPUESTO A DIFERENTES  
INMUNOESTIMULANTES

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Acuicultura)

Presenta

**Miriam Victoria Martín Manzo**

La Paz, Baja California Sur, Octubre de 2012

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 13 del Mes de Septiembre del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Concentración de lectina en la hemolinfa del camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuesto a diferentes inmunoestimulantes"**

Presentada por el alumno:

**Miriam Victoria Martín Manzo**

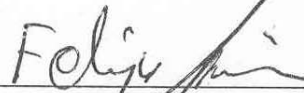
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

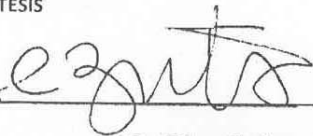
LA COMISION REVISORA



Dr. Angel Isidro Campa Córdova  
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
CO-TUTOR



Dr. Edgar Zeñeno Galindo  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Comité tutorial de tesis**

- Director de tesis: Dr. Angel Isidro Campa Córdova
- Co-tutor: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
- Co-tutor: Dr. Edgar Zenteno Galindo

**Comité revisor de tesis**

- Dr. Angel Isidro Campa Córdova
- Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
- Dr. Edgar Zenteno Galindo

**Jurado de Examen de Grado**

- Dr. Angel Isidro Campa Córdova
- Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
- Dr. Edgar Zenteno Galindo
- Suplente: Dra. Norma Y. Hernández S.

## RESUMEN

La lectina del suero del camarón blanco (*L. vannamei*) se purificó por cromatografía de afinidad, utilizando estroma de eritrocitos de rata fijados con glutaraldehído. En el análisis de la lectina en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se identificaron cuatro fracciones de 83.14, 64.01, 46.16 y 33.29 kDa. La lectina aglutina eritrocitos de diferentes especies (conejo, rata, humano, cobayo y hámster) y tiene una mayor actividad aglutinante con los eritrocitos de ratón. La actividad aglutinante aumentó en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ , así como en presencia de eritrocitos tratados con tripsina o con sialidasa. La actividad hemaglutinante fue inhibida por glucosamina, fucosa, glucosa y galactosa. Se evaluó el efecto de dos mezclas de bacterias del género *Bacillus* ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), de la levadura *Debaryomyces hansenii* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) y del inmunoestimulante comercial laminarina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) en la concentración de lectina en la hemolinfa del camarón blanco *L. vannamei*. Los tratamientos se agregaron directamente al agua de los camarones cada 3 días. El bioensayo tuvo una duración de 14 d, se extrajo hemolinfa con anticoagulante de tres camarones por cada tratamiento a las 24, 48 y 72 h después de aplicados los tratamientos. La concentración de lectina de los camarones se determinó por ELISA, utilizando anticuerpos monoclonales contra la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (crustácea decápoda). Nuestros resultados confirman que los anticuerpos reconocen epítopes comunes con camarón, pero no se identificaron diferencias significativas entre la concentración de lectina en el plasma de *L. vannamei* expuestos a diferentes tratamientos y los organismos control sin tratamiento.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, lectina, inmunoestimulantes

## ABSTRACT

The lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei* was purified by affinity chromatography on glutaraldehyde-fixed stroma from rat erythrocytes. Analysis of the lectin by polyacrylamide gel electrophoresis under reductive conditions showed four fractions of 83.14, 64.01, 46.16 and 33.29 kDa. The lectin agglutinates erythrocytes of different species (rabbit, rat, human, guinea pig and hamster) and has the higher agglutinating activity for mouse erythrocytes. The agglutinating activity increases in the presence of  $\text{Ca}^{++}$ , as well as with erythrocytes treated with trypsin or sialidase. The hemagglutinating activity was inhibited by glucosamine, fucose, glucose and galactose. It was evaluated the effect of two mixes of *Bacillus* bacteria genus ( $2 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), the yeast *Debaryomyces hansenii* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) and the commercial immunostimulant laminarin ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) on the concentration of lectin in the shrimps' hemolymph. The treatments were directly added to the shrimps' water every 3 days. The experiment lasted 14 d; hemolymph was extracted with anticoagulant from three shrimps of each treatment at 24, 48, and 72 h after the treatments. The shrimps' lectin concentration was determined by ELISA using monoclonal antibodies generated against *Macrobrachium rosenbergii* lectin. Our results confirm that the antibodies recognize common epitopes with shrimp, but we didn't identify significant differences between the lectin concentration in the plasma of the treated white shrimps (*L. vannamei*) and the lectin concentration in the plasma of the control organisms without treatment.

Key Words: *Litopenaeus vannamei*, lectin, immunostimulants

## DEDICATORIAS

A todas esas personas, que han llenado mi corazón de sonrisas, que han hecho de mi mundo un mundo mejor, que han reído y llorado conmigo, que han alentado mis sueños y que me han compartido de su tiempo, haciendo de mi una mejor persona.

A Dios por haberme otorgado el regalo de la vida

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por permitirme realizar este trabajo y por la extensión de la beca.

A CONACYT por apoyarme económicamente con la beca número 243633 y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Al proyecto PAPIIT (IN226211-3) y al proyecto CONACYT (129932) por financiar en parte esta investigación.

Al departamento de bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y por todas las facilidades que me dieron para desarrollar el proyecto.

A todas las personas que trabajan en el laboratorio de patología del CIBNOR: por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

A mis asesores Dr. Angel Campa, Dr. Edgar Zenteno, Dr. Felipe Ascencio: por sus atenciones, su orientación, apoyo e interés durante el desarrollo del trabajo y por compartir su conocimiento y experiencia.

Ali Pereyra Morales: por su valioso apoyo técnico brindado durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Concepción Agundis: por todas sus atenciones, apoyo y ayuda durante mi estancia en la UNAM, por compartir su conocimiento y experiencia conmigo, por brindarme su confianza y cariño y por apoyarme en los momentos difíciles, motivándome a seguir adelante y no perder la esperanza.

A Arturo Sierra: por su ayuda y enseñanza inicial en las técnicas de laboratorio, por todas sus sugerencias y comentarios realizados durante la realización de este proyecto.

A Irasema E. Luis Villaseñor: por sus enseñanzas en técnicas de microbiología, por su valiosa ayuda y apoyo durante el desarrollo del bioensayo y por brindarme su amistad

A Alí, José Luis (el niño fiel), Oscar (Joserra): por enseñarme técnicas de laboratorio, por ayudarme y darme consejos durante la realización de este trabajo, por hacer ameno el trabajo de laboratorio con sus ocurrencias y por brindarme su amistad.

A Pablito: por su gran ayuda y apoyo durante el desarrollo del bioensayo.

A todo el personal de Posgrado: por su trato amable y por orientarme y aclarar todas mis dudas sobre los trámites administrativos.

A mis profesores del CIBNOR: por compartir su conocimiento en diferentes áreas, contestar mis dudas y motivarme a seguir aprendiendo.

A Horacio Sandoval por su trato amable y disponibilidad para ayudar en el laboratorio de cómputo.

Al personal de la biblioteca: por todo el apoyo brindado con el material bibliográfico y por su trato amable.

A mis padres: porque gracias a su apoyo, esfuerzo y cariño he podido soñar y cumplir mis sueños, he aprendido que nada es imposible y que la felicidad existe.



Siempre estarán en mi corazón y les estaré eternamente agradecida por creer en mí y por ayudarme en todo momento.

A mi chulada de abuela: por tu amor, cariño y comprensión; y por todos tus consejos que me han hecho reflexionar y tomar mejores decisiones.

A mi hermana Alejandra: por todas las aventuras que hemos compartido desde que éramos pequeñas, porque a pesar de la distancia te has mantenido cerca, escuchándome y apoyándome cuando más lo he necesitado y porque sé que siempre podré contar contigo.

A mi novio Abel: por devolverme ese brillo en mis ojos, llenar mis días de alegría, por apoyarme y ayudarme en todo lo que has podido desde que nos conocimos, por escucharme y resolver mis dudas existenciales y por brindarme tu amor sincero.

A la memoria de mi abuelo materno: porque fuiste un ejemplo de lucha y superación y por todo el amor que me diste.

A la memoria de mis abuelos paternos: por haberme querido tanto y por los momentos felices que compartimos.

A Edith Martínez: por su amistad, afecto y apoyo incondicionales a lo largo de estos años.

A Maria Amparo Bornacini: por los momentos que hemos compartido desde la niñez.

A mis compañeros de maestría por todos los momentos compartidos durante estos años, haciéndome el camino más ameno y lleno de experiencias positivas.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
DEDICATORIAS.....	III
AGRADECIMIENTOS .....	IV
CONTENIDO .....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS .....	X
La camaronicultura en México.....	1
Enfermedades que afectan la camaronicultura en México.....	2
Respuesta inmune del camarón.....	2
Lectinas .....	4
Inmunoestimulantes .....	5
ANTECEDENTES.....	7
Inmunoestimulantes ( $\beta$ -1,3 glucanos y peptidoglucanos) utilizados en camarón.....	7
Lectinas identificadas en camarones.....	9
JUSTIFICACIÓN .....	11
OBJETIVO.....	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
HIPÓTESIS.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Obtención de los organismos .....	12
Obtención del suero de camarón .....	12

Aislamiento y Purificación de la lectina .....	12
Determinación de Proteínas .....	13
Determinación del peso molecular de la lectina.....	13
Actividad hemaglutinante de la lectina .....	14
Especificidad.....	15
Preparación de los Inmunoestimulantes.....	15
Cultivo de juveniles de <i>L. vannamei</i> tratados con inmunoestimulantes comerciales y <i>D. hansenni</i> . .....	16
Obtención de hemolinfa .....	16
Determinación de la concentración de lectina.....	17
Análisis Estadísticos .....	18
RESULTADOS.....	19
Aislamiento de lectina por cromatografía de afinidad .....	19
Determinación de proteínas.....	20
Determinación del peso molecular de la lectina.....	20
Actividad hemaglutinante .....	21
Especificidad .....	22
Determinación de la concentración de lectina.....	23
DISCUSIÓN .....	26
CONCLUSIONES .....	35
LITERATURA CITADA .....	37

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Perfil de elusión de la lectina de *Litopenaeus vannamei* del suero de los camarones por cromatografía de afinidad utilizando una columna con estroma de eritrocitos de rata. Densidad óptica a 280 nm (línea sólida) y actividad hemaglutinante (línea punteada) en la presencia de eritrocitos de conejo al 2%. ..... 19
- Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con urea de la lectina purificada. Carril (a): Marcadores moleculares. Carril (b): lectina purificada de camarón *L.vannamei*. ..... 20
- Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE. Carril (a): Marcadores moleculares. Carril (b): Suero de camarón *L.vannamei*. Carril (c) Fracción no retenida. Carril (d) Lectina de *L.vannamei* purificada. .... 21
- Figura 4. Curva estándar de lectina de *Machrobrachium rosenbergii*. ..... 23
- Figura 5. Western blot de lectina de camarón *L.vannamei* utilizando anticuerpos contra MrL. .... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 6. Muestreo realizado 24 h después de la quinta aplicación del tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. <sup>1</sup> Prueba de ANOVA  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. <sup>2</sup> Prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $p > 0.20$  indica una distribución normal. . 24
- Figura 7. Muestreo realizado 48 h después de la tercera aplicación del tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. <sup>1</sup> Prueba de ANOVA  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. <sup>2</sup> Prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $p > 0.20$  indica una distribución normal. . 25
- Figura 8. Muestreo realizado 72 h después de la cuarta aplicación del tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. <sup>1</sup> Prueba de ANOVA  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. <sup>2</sup> Prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $p > 0.20$  indica una distribución normal. . 25

**LISTA DE TABLAS**

Tabla I. Distribución de la producción en México .....	1
Tabla II. Actividad hemaglutinante de las fracciones retenidas .....	19
Tabla III. Concentración de proteínas en las diferentes etapas de la purificación de lectina de <i>L. vannamei</i> contenidas en 300 $\mu$ L de suero .....	20
Tabla IV. Actividad hemaglutinante del suero de camarón .....	22
Tabla V. Especificidad de lectina .....	23

## INTRODUCCIÓN

### La camaronicultura en México

La industria del camarón que incluye la captura, acuicultura, procesos y servicios, es la principal pesquería en México desde el punto de vista económico y la que concentra el mayor desarrollo acuícola del país. En el país se producen al año 196 mil toneladas de camarón entero, el 66 % de éstas (130 mil toneladas) provienen de la acuicultura, y el 34% (66 mil toneladas), corresponden a la captura en altamar y bahías. Esta actividad en conjunto sostiene 225 mil empleos, genera 359 millones de dólares en divisas (SAGARPA, 2010). Los pronósticos de crecimiento en la producción nacional de camarón para el periodo 2008-2015 muestran una tasa media de crecimiento anual de 2.91%, pasando de 197,535 a 241,457 toneladas (Reyes-Moreno *et al.*, 2009).

El consumo nacional muestra una tendencia creciente; en el 2008 se consumieron 156,587 toneladas de camarón en el mercado interno y el consumo per cápita anual presenta una tasa media de crecimiento anual del 13% al pasar de un consumo per cápita de 0.74 kg en 2002 a 1.47 kg en 2008. Las exportaciones de camarón se han incrementado con una tasa media de crecimiento anual del 9.76% al pasar de 30,805 toneladas en 2002 a 53,866 toneladas de camarón peso vivo en 2008 (Reyes-Moreno *et al.*, 2009). Como se indica en la tabla I Baja California Sur tiene el mejor rendimiento de la república mexicana en la producción de camarón.

**Tabla I.** Distribución de la producción en México

Producción de camarón de acuicultura en México 2008				
Estado	Hectáreas Sembradas	Postlarvas Sembradas	Producción (toneladas)	Rendimiento (kg/ha)
Sonora	21,039	4,896,860,000	81,312	3,865
Sinaloa	40,866	3,628,580,331	38,506	942
Nayarit	5,088	450,991,770	5,059	994
Colima	350	137,273,516	1,515	4,329
BCS	643	230,500,000	3,504	5,449
Tamaulipas	749	189,960,000	2,602	3,474
BC	109	23,484,000	193	1,772
Tabasco	211	41,100,000	217	1,029
Jalisco	262	17,800,000	106	405
<b>Total</b>	<b>66,468</b>	<b>8,829,833,329</b>	<b>133,014</b>	<b>2,001</b>

Fuente: Estimaciones FIRA con datos de la Revista Industrial Acuícola 2008 y Comités Estatales de Sanidad Acuícola 2008 v 2009

## **Enfermedades que afectan la camaronicultura en México**

Los camarones son afectados por diversas enfermedades, causadas por bacterias, hongos, parásitos y virus. Las enfermedades virales representan uno de los factores limitantes más importantes de la camaronicultura ya que no se cuenta con tratamientos adecuados para su control. Existen 30 virus conocidos, de los cuales a cuatro se les reconoce actualmente por tener un marcado impacto negativo en los laboratorios y granjas de camarón siendo estos: virus de la necrosis infecciosa hipodermal y hematopoyética (IHHNV), virus del síndrome de taura (TVS), Síndrome del Virus de la mancha blanca (WSSV), virus de la cabeza amarilla (YHV) (CONAPESCA, 2001).

Actualmente, el virus de la mancha blanca (WSSV), se presenta en los estados de Sonora, Nayarit y Sinaloa, el cual ha causado grandes pérdidas en la producción de camarón. En el caso de IHHNV, se registra un caso en Nayarit (SAGARPA, 2012). El virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) representa un peligro para la camaronicultura, la mortalidad acumulada por esta infección puede alcanzar 90-100% de 3 a 10 días después de la aparición de los signos clínicos (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010). El WSSV se detectó por primera vez en Taiwán, en 1992, y se dispersó rápidamente por el continente asiático; en 1995 fue registrado en Texas y hasta el año 2000 se confirmó su presencia en México, donde causó mortalidades cercanas a 100% en cultivos de camarón blanco *L. vannamei*. En Sinaloa se obtuvieron cosechas tempranas y por ende tallas pequeñas de *Penaeus vannamei* y *Penaeus stylorostris* en el 2002 y en Sonora, el virus provocó pérdidas importantes cercanas a 15,000 toneladas en el 2005 (Sánchez *et al.*, 2008), disminuyó la producción de camarón un 40% en el 2010 y un 52% en el 2011 (CONAPESCA, 2012).

## **Respuesta inmune del camarón**

Los camarones carecen de una respuesta inmune específica o adaptativa, por lo que dependen de la respuesta innata para combatir a los agentes extraños. Esta respuesta incluye la protección por barreras físicas y por los sistemas celular y humoral (Vázquez-Moreno *et al.*, 1998). Los virus y los componentes virales como el ADN y ARN generados en las células infectadas pueden ser reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones

(PRR) del camarón como las lectinas. Después del reconocimiento de los virus, los PRR promueven una respuesta antiviral adecuada que incluye la respuesta celular y la respuesta humoral (Liu *et al.*, 2009) (Vázquez-Moreno *et al.*, 1998) (Yang *et al.*, 2008). Dentro de la respuesta celular los hemocitos hialinos pueden fagocitar el virus y formar esferoides (gigantescas masas de células fagocitarias) en tejido conectivo y en el Órgano Linfoide (Anggraeni *et al.*, 2000) y dentro de la respuesta humoral se activan los siguientes factores:

- Factor anti-lipopolisacárido (ALF): Esta proteína se ha identificado principalmente en el órgano linfoide y corazón, pero también en branquias, hemocitos y hepatopáncreas de los camarones. Se desconoce su mecanismo de acción en camarones, pero en los cangrejos, actúa inhibiendo la adhesión de virus a las células, lo cual sugiere que ALF actúa durante la fase inicial de la entrada del virus (Liu *et al.*, 2009).
- Factor transductor de señal y activador de la transcripción (STAT): proteína que induce la expresión de varios genes para la producción de citocinas. Sin embargo el gen *ie1* del virus emplea el sistema STAT del camarón como un factor de transcripción, aumentando su expresión y resultando en la activación de su promotor en las células del huésped (Liu *et al.*, 2009).
- Lisozima: enzima que se encuentra expresada principalmente en el hepatopáncreas; tiene actividades hidrolíticas contra proteoglicanos (Pei-Feng *et al.*, 2009)
- Producción del anión superóxido: este radical libre es producido intracelularmente en los hemocitos y como resultado del sistema profenoloxidasa en la hemolinfa (la quinona generada en el proceso puede entrar en un ciclo redox enzimática y no enzimática produciendo los correspondientes radicales semiquinona y generando el anión superóxido) (Philipp *et al.*, 2011). El anión superóxido puede matar directamente al organismo invasor, no distingue entre células propias y no propias, lo que implica que son capaces de causar daño en caso de actuar en espacios extracelulares. Este radical es regulado por mecanismos que incluyen moléculas antioxidantes como el ácido ascórbico y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y peroxidasas (Pei-Feng *et al.*, 2009)



- Hemocianina: Se purificó hemocianina del camarón *P. monodon* mediante cromatografía de afinidad utilizando como ligando al WSSV previamente purificado. Se ha visto que tiene actividad antiviral contra 6 virus de peces, afectando la replicación de los virus, pero no es capaz de destruirlos, por lo que su mecanismo antiviral se desconoce (Zhang *et al.*, 2004).
- Lectina tipo C (LvCTL1): las lectinas son proteínas o glicoproteínas que aglutinan diversos grupos celulares, bacterias y virus, están involucradas aparentemente en el reconocimiento y fagocitosis de agentes patógenos y células como opsoninas (Freire Marques y Barraco, 2000).

## **Lectinas**

Las lectinas (del latín *legere*: buscar o escoger) son proteínas o glicoproteínas que actúan como unidades de reconocimiento; reconocen de manera específica a los carbohidratos de superficie de membrana y desencadenan diferentes mecanismos de defensa como son: activación del estallido respiratorio, inducción del sistema profenoloxidasa, aglutinación, fagocitosis mediada por opsonización y encapsulación de virus, bacterias y hongos, además algunas lectinas pueden presentar actividad antimicrobiana (Vázquez-Moreno *et al.*, 1998; Xian-Wei *et al.*, 2012). Las lectinas se expresan principalmente en los hemocitos y hepatopáncreas (Zarian, 2007). Las lectinas han sido identificadas en el suero de prácticamente todos los crustáceos decápodos y en la membrana de los hemocitos, así como en gránulos citoplasmáticos, sugiriendo que las lectinas son sintetizadas por los hemocitos y posteriormente liberadas al hemocele (Vázquez-Moreno *et al.*, 1998).

Las lectinas han sido clasificadas de acuerdo a algunas propiedades químicas como lectinas tipo C, que requieren de calcio para su funcionamiento y las Lectinas tipo S, las cuales requieren de tioles libres para su estabilidad (Freire Marques y Barraco, 2000).

## **Inmunoestimulantes**

Los inmunoestimulantes, se encuentran disponibles como tratamientos alternativos, actuando como moléculas de alarma que activan el sistema inmune. La mayoría son compuestos químicos los cuales se encuentran como elementos estructurales de bacterias, micelios de hongos y levadura (Zarian, 2007). Los inmunoestimulantes ofrecen los siguientes beneficios, reducir la mortalidad debido a patógenos oportunistas, prevenir enfermedades por virus y mejorar la resistencia a parásitos (Alpuche *et al.*, 2005) y se pueden clasificar de la siguiente manera: elementos estructurales de bacterias (lipopolisacáridos, lipopéptidos, glicoproteínas capsulares, muramilpéptidos, peptidoglucanos), productos de bacterias  $\beta$ -1,3 glucano (Curdlan) y micelios de hongos (Krestin, Lentinan, Schizophyllan, Scleroglucan, SSG, VitaStim), B-1,3/1,6 glucanos de la pared celular de levaduras, estructuras complejas de carbohidratos (glicanos) de varias fuentes biológicas incluyendo algas como el fucoidan, péptidos presentes en extractos de ciertos animales o a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de peces, nucleótidos, productos sintéticos (bestatin, FK-156, FK- 565, Levamisole) (Zarian, 2007).

Los inmunoestimulantes más utilizados para evaluar los efectos que provocan sobre el sistema inmune de camarones forman parte del grupo de los lipopolisacáridos (LPS),  $\beta$  1,3/1,6 glucanos y peptidoglucanos. Estos inmunoestimulantes se unen a los diferentes PRR como son la proteína ligadora de B glucanos (BGBP), proteína ligadora de lipopolisacáridos y glucanos (LGBP) y las homologas proteína/serina proteinasa (SPH), provocando la degranulación de los hemocitos granulares y semigranulares liberando así diversas proteínas relacionadas con el sistema inmune (Vargas-Albores *et al.*, 1998) como son la proPO, la enzima activadora de ProPO, peroxinectina, péptidos antimicrobianos (peneidinas, péptidos derivados de la hemocianina, histonas), moléculas citotóxicas (lisozimas, esterasas, fosfatasas, fosfolipasas, peroxidases y proteasas), aglutininas, inhibidores de proteasas entre otras (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2009).

Los Lipopolisacáridos (LPS) son estimulantes de la respuesta celular *in vitro*, además estimulan a los hemocitos hialinos causando la liberación de la enzima transglutaminasa,

provocando la coagulación del plasma (Vargas-Albores *et al.*, 1998). Sin embargo estos productos *in vivo* pueden causar inflamaciones severas y pueden ser tóxicos en concentraciones ligeramente por arriba de la dosis óptima. Los  $\beta$ 1,3/1,6 glucanos se encuentran en micelios de hongos y levaduras y la alimentación de camarones con estas mismas sustancias resulta en un crecimiento más rápido, en mortalidad reducida y mejor utilización de alimento (Alpuche *et al.*, 2005)

## ANTECEDENTES

### **Inmunoestimulantes ( $\beta$ -1,3 glucanos y peptidoglucanos) utilizados en camarón**

Los glucanos han sido ampliamente utilizados como inmunoestimulantes para aumentar la resistencia de crustáceos contra las enfermedades virales. Sukumaran *et al.* (2010), reportaron que los glucanos (0.2% en el alimento) de las levaduras marinas *Debaryomyces hansenii* S8, *D. hansenii* S169 aumentaron la sobrevivencia de las post-larvas *P. monodon* infectados con WSSV teniendo una supervivencia al día 7 de un 44.42 % y 41.11% respectivamente (Sukumaran *et al.*, 2010). Sarlin y Philip (2011), obtuvieron una supervivencia al día 7 del 50% de los camarones *Fenneropenaeus indicus* retados con WSSV al incluir 15% de biomasa de *D. hansenii* S8 en el alimento. En juveniles del camarón *P. monodon* alimentados con  $10 \text{ g kg}^{-1}$   $\beta$ -1,3 glucanos de *Schizophyllum commune* en la dieta y retados con WSSV, se consiguió una supervivencia del 65% (Chang *et al.*, 2003).

También se han realizado varios estudios sobre el efecto de los  $\beta$ -1,3 glucanos en algunos factores de la respuesta inmune innata de los camarones. Hong-Xia *et al.* (2011), le administraron  $\beta$ -1,3 glucanos derivados de *Laminarina digitata* a los camarones *L. vannamei* y observaron que la administración oral de esos glucanos a una concentración de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  de alimento por 84 días estimuló el sistema inmune (incrementó la actividad catalasa y actividad lisozima). Campa-Córdova *et al.* (2005), utilizaron como inmunoestimulantes  $\beta$ -1,6 glucano extraído de *Saccharomyces cerevisiae*, mezclaron las suspensiones de  $\beta$ -1,6 glucano en agua de mar en 50 L de agua para obtener una concentración final de  $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$  y encontraron que 48 h después de la exposición de juveniles de camarón blanco a ese inmunoestimulante por 6 h hubo un incremento significativo en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Campa-Córdova *et al.*, 2005).

Los peptidoglucanos están presentes en la pared celular de las bacterias Gram+ y han tenido éxito al ser utilizados como inmunoestimulantes en los camarones. Peraza-Gómez *et al.* (2009), observaron que el uso de una mezcla de bacterias ácido lácticas ( $1 \times 10^6 \text{ CFU g}^{-1}$ )

aumentó la supervivencia y disminuyó la prevalencia del virus de la mancha blanca en el camarón *L. vannamei*. Purivirojkul *et al.* (2006), se dieron cuenta que el peptidoglucano incorporado a la dieta en una dosis de  $0.18 \text{ g kg}^{-1}$  de alimento estimuló la inmunidad de *P. monodon* al elevar la actividad fenoloxidasa, el anión superóxido y la actividad bactericida. En *Marsopenaes japonicus* se reportó que al administrar  $0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso vivo obtenido de *Bifidobacterium thermophilum* por 30 días aumentó la resistencia del camarón al ser retado con WSSV durante ese periodo, obteniéndose una supervivencia de 97.6% y 20 días después de suspender la dieta con *B. thermophilum* los camarones empezaron a morir (Itami *et al.*, 2002). Además en varias investigaciones se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* pueden estimular la respuesta del sistema inmune y/o la resistencia al virus de la mancha blanca. Li *et al.* (2009), vieron que al incorporar a la dieta *Bacillus megenterium* a una dosis de  $10^8 \text{ CFU g}^{-1}$  de alimento combinado con 0.2% de isomalto-oligosacáridos (IMO) por 14 días, aumentó significativamente la supervivencia de *L. vannamei* al ser retado contra el WSSV. Además también observaron que algunos parámetros inmunológicos como fagocitosis, anión superóxido y actividad de la fenoloxidasa fueron significativamente más altos que los del control. *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* también han mostrado ser buenos estimulantes al combinarse, ya que al utilizarlos por dos semanas en la dieta a una concentración de  $10^8 \text{ CFU g}^{-1}$  junto con 0.2% de IMO se obtuvieron los niveles significativamente más altos de hemocitos, actividad fenoloxidasa, lisozima, actividad de óxido nítrico sintetasa y de la superóxido dismutasa que los obtenidos con el control (Zhang *et al.*, 2011). Rengpiptat *et al.* (2000), demostraron que al administrar *Bacillus* S11 en una concentración de  $10^{10} \text{ CFU g}^{-1}$  a postlarva de 60 días de edad de *P. monodon*, aumentó la actividad fagocítica al día 60 de tratamiento y al día 30 incrementó significativamente la actividad de la fenoloxidasa, también observaron que en poslarvas de 10 días de edad, al aplicar el mismo tratamiento hubo un incremento significativo de número de hemocitos y de actividad de fenoloxidasa después de 90 días. Sin embargo pocos son los estudios sobre el efecto de los  $\beta$ -1,3 glucanos y de los peptidoglucanos en las lectinas, como el realizado por Sritunyalucksana *et al.* (1999), donde utilizaron la fracción lisada de hemocitos de camarón *P. monodon* que incluye plasma y sustancias liberadas de los hemocitos, para determinar el efecto del

lipopolisacárido de *E.coli*, del peptidoglucano y de los  $\beta$ -1,3 glucanos extraídos de laminaria en la enzima fenoloxidasa, la aglutinación y el efecto antibacterial. Encontraron que 0.002% de LPS de *E. coli* y 0.4% de peptidoglucano estimuló la actividad de la fenoloxilasa y que utilizando de 0.4 a 0.8% de laminaria no tuvo ningún efecto sobre la enzima. Sin embargo el peptidoglucano, lipopolisacarido de *E. coli* y la laminaria fallaron en incrementar la aglutinación de *E. coli* y de eritrocitos humanos y tampoco tuvieron efecto antimicrobiano contra *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, Pais *et al.* (2008), realizaron un estudio que demuestra que la actividad hemaglutinante (contra los eritrocitos de ratón) de la hemolinfa del *P. monodon* aumentó después del tratamiento con glucanos (obtenidos de *Saccharomyces cerevisiae*) y una bacterina de vibrio (obtenida de *Vibrio harveyi*). Lo cual sugiere que las lectinas de la hemolinfa capaces de hemaglutinar eritrocitos de ratón fueron estimuladas por los inmunoestimulantes utilizados.

### **Lectinas identificadas en camarones**

Se han identificado y caracterizado lectinas en varias especies de camarones, algunas de ellas reconocen bacterias y otras reconocen virus, causando su aglutinación, encapsulación y/o fagocitosis. Se ha demostrado que algunas lectinas por su especificidad reconocen y aglutinan diversas especies bacterianas:

- FC-L: se encuentra en la hemolinfa del camarón *Fenneropenaeus chinensis* y aglutina algunas bacterias Gram negativas (Sun *et al.*, 2003).
- Fc-hsL y FcLec4: se identificaron en el camarón *F. chinensis* y tiene alta actividad antimicrobiana (Sun *et al.*, 2008) (Xian-Wei *et al.*, 2009).
- LvLec: se encontró en el camarón *Litopenaeus vannamei* y provoca la aglutinación de *Escherichia coli* (Sun *et al.*, 2007).
- PmLT: registrado en *Penaeus monodon*, funciona como PRR incrementando la encapsulación de bacterias por hemocitos (Luo *et al.*, 2006).

Se han identificado que algunas lectinas actúan contra el virus de la mancha blanca al interactuar con sus glicoproteínas:

- Fclectin: identificada en *F. chinensis*, aumenta su expresión en los hemocitos 3 h después de ser infectados por el WSSV (Liu *et al.*, 2007).
- LvLT: encontrada en *L. vannamei*, disminuyó su expresión en el hepatopáncreas 2 horas después de ser infectados por el WSSV, aumentando 4 h después de la infección (Ma *et al.*, 2007).
- FcLec3: encontrada en *F. chinensis*, interactúa con la glicoproteína VP28 del virus (Xian-Wei *et al.*, 2009).
- LvCTL1: identificada en *L. vannamei*, se une a glicoproteínas de la envoltura viral (VP95, VP28, VP26, VP24, VP19, VP14) (Zhi-Ying *et al.*, 2009).
- MjLecC, MjLecA, y MjLecB: identificadas en *Marsupenaeus japonicus*, se unen a las glicoproteínas VP28, VP26; VP28 y VP28 respectivamente (Kang *et al.*, 2010).

## JUSTIFICACIÓN

Los camarones son afectados por diversas enfermedades, dentro de las cuales las enfermedades virales representan uno de los factores limitantes más importantes de la camaronicultura, ya que actualmente han causado un gran impacto negativo sobre la producción de camarón del país y no se cuenta con tratamientos adecuados para su control. Se ha visto que las lectinas reconocen bacterias y virus y que algunos inmunoestimulantes (peptidoglucanos y  $\beta$ -1,3 glucanos) aumentan la supervivencia contra el virus de la mancha blanca y también aumentan otros factores inmunológicos (actividad superóxido dismutasa, fagocitosis, actividad fenoloxidasa, anión superóxido, lisosima, actividad óxido nítrico sintetasa). Por lo que se pretende evaluar el efecto de diferentes inmunoestimulantes aplicados a los camarones en la concentración de lectina en la hemolinfa de *L.vannamei*, lo cual aportará nuevos conocimientos y alternativas para el control de enfermedades infecciosas.

## OBJETIVO

Determinar la concentración de lectina en la hemolinfa del camarón blanco (*L.vannamei*) expuesto a diferentes inmunoestimulantes.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar lectina de la hemolinfa del camarón blanco (*L.vannamei*).
2. Determinar la concentración de lectina en la hemolinfa del camarón blanco expuesto a diferentes inmunoestimulantes.

## HIPÓTESIS

Si el camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) es expuesto a diferentes inmunoestimulantes, la concentración de lectina aumentará en la hemolinfa.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de los organismos

Se utilizaron organismos adultos de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* obtenidos de los estanques de mareas Laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, La Paz, Baja California Sur, México). Los camarones fueron aclimatados durante 15 días antes de iniciar los experimentos en tanques de fibra de vidrio de 1,500 litros con agua de mar filtrada (5  $\mu\text{m}$ ) a una temperatura de 28 °C y aireación constante. Los camarones fueron alimentados diariamente *ad libitum* en la mañana y en la tarde con alimento comercial marca PIASA (35% de proteína).

### Obtención del suero de camarón

A cada camarón se le extrajo aproximadamente 1 ml de hemolinfa sin anticoagulante de la base del pleópodo del primer segmento abdominal cerca del poro genital. La hemolinfa fue centrifugada a 16,000 g por 30 min para obtener el suero, el cual se mantuvo en congelación a -4 °C hasta su utilización (Alpuche *et al.*, 2005).

### Aislamiento y Purificación de la lectina

La lectina fue purificada por cromatografía de afinidad, utilizando una matriz de eritrocitos de rata, contenidos en una columna de Sephadex G-25 (15 x 2cm) preparada de acuerdo al método descrito por Ochoa JL y Kristlansen T (1978), para ello se lisó la sangre de rata obteniendo los residuos de la membrana de los eritrocitos, éstos se fijaron con glutaraldehído al 3% toda la noche a 4°C, se bloquearon con glicina 1 M toda la noche a 4°C y se empacaron en una columna conteniendo Sephadex G-25 (Ochoa y Kristlansen, 1978). La columna fue equilibrada con solución salina al 0.9%, se aplicaron 300  $\mu\text{L}$  de suero de *L. vannamei* (previamente incubados 20 min a 37°C con 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  40 mM) a la columna a un flujo de 2 ml  $\text{min}^{-1}$  y el material no retenido fue eluído con solución salina al 0.9% hasta que la densidad óptica a 280 nm de las fracciones colectadas (2 ml)

fuera menor a 0.001. La lectina fue eluída posteriormente de la columna utilizando ácido acético al 3%.

Se determinó actividad hemaglutinante utilizando eritrocitos de conejo y rata al 2% en solución salina-calcio (NaCl 0.85% y Ca 5mM) y absorbancia a 280 nm a cada una de las fracciones colectadas. Las fracciones eluídas con ácido acético que presentaron absorbancia a 280 nm fueron concentradas y dializadas contra solución salina al 0.9%, para poder realizar la aglutinación de eritrocitos de conejo y rata al 2% en solución salina-calcio y TBS-Ca. (TrisHCl 50 mM, NaCl 115 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaN<sub>3</sub> 0.02%).

### **Determinación de Proteínas**

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Se colocaron 10 µl de muestra en una microplaca y se agregaron 200 µl de la solución de Bradford. La absorbancia se leyó a 570 nm. Utilizando la curva estándar de albúmina sérica bovina se determinó la concentración de proteínas (mg ml<sup>-1</sup>) del suero de camarón, de las fracciones no retenidas y las retenidas que fueron concentradas y dializadas.

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

Para identificar el grado de homogeneidad y determinar el peso molecular de la lectina se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con urea de acuerdo al método descrito por Bollag *et al.* (1996). La lectina purificada (100 µL o 25 µL, según la turbidez de la muestra) fue precipitada con Ácido tricloroacético (TCA) al 20% y acetona, y suspendida en 20 µL de amortiguador de muestra (Tris-HCl 125 mM, Urea 6 M, SDS 4%, Glicerol 20%, azul de bromofenol 0.02%, DTT 0.2 M).

También se realizó una electroforesis del suero, fracción no retenida y fracción retenida de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970) utilizando geles de poliacrilamida al 10% y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se usaron 2 µl de agregado de lectina (fracción retenida); 20 µg de suero y 20 µg de la fracción no retenida que fueron precipitados con TCA al 20% y acetona y suspendida en 15 µL de amortiguador (SIGMA).

Posteriormente fueron sometidas a ebullición por 10 min. Se utilizaron estándares de peso molecular conocido con un rango de 6.5 a 205 kDa (Amersham Biosciences, UK). La migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 80V, en amortiguador de corrida (TRIS 0.025 M, glicina 0.190 M, SDS 0.2%). El gel se tiñó con plata utilizando el kit “*Bio-Rad Silver Stain*” (Bio-Rad, 2011).

La migración relativa (Rf) de los estándares y la muestra se calcularon con la fórmula:  $Rf = \text{distancia de migración de la proteína} / \text{distancia de migración del colorante}$ , se construyó una curva estándar para calcular el peso molecular de la lectina purificada.

### **Actividad hemaglutinante de la lectina**

Se obtuvieron eritrocitos de ratón, rata, conejo, hámster y cobayo del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM y eritrocitos humanos tipo A, B y O del banco de sangre del IMSS, México. Se evaluó la actividad hemaglutinante de lectinas de camarón de acuerdo al método descrito por Alpuche *et al.* (2005) para *Litopenaeus setiferus*. La sangre de las diferentes especies se colectó con heparina y los eritrocitos fueron lavados 3 veces con PBS y centrifugados (800 g por 10 min). Para determinar la actividad hemaglutinante se realizaron diluciones dobles seriadas en PBS y en solución salina-calcio (NaCl .85% y CaCl<sub>2</sub> 5mM) del suero de camarón en platos U de microtitulación, a las cuales se les colocaron 25 µl de eritrocitos al 2% en PBS. La actividad hemaglutinante se reportó como el inverso de la última dilución que mostró actividad aglutinante visible. Los ensayos de hemaglutinación también se realizaron en presencia de eritrocitos tratados previamente con sialidasa (0.1 U de sialidasa tipo V de *Clostridium perfringens* (SIGMA Chem. Co., St Louis Mo., USA) por 0.5 ml de paquete de eritrocitos incubados a 37°C por 30 min, usando como control positivo la lectina *Arachis Hypogaea* (SIGMA)) y con tripsina (0.5 mg de tripsina SIGMA por 0.5 ml de paquete de eritrocitos incubados 1 h a temperatura ambiente, usando como control positivo lectina de amaranto).

## Especificidad

La especificidad de la lectina por los azúcares se determinó comparando la actividad inhibitoria de varios carbohidratos (D-Galactosa, D-Galactosamina, N-Acetil-D-Galactosamina, D-Glucosa, D-Glucosamina, N-Acetil-D-glucosamina, D-Manosa, D-manosamina, L-fucosa). Se realizaron diluciones dobles seriadas en solución salina-Calcio del suero de camarón en platos U de microtitulación, se incubaron 30 min a 37°C con 25  $\mu$ L de azúcares a 400 mM. Inmediatamente después, se añadieron 25  $\mu$ L de eritrocitos de conejo al 2% en PBS. La capacidad inhibitoria se expresó en porcentaje de inhibición, que corresponde al porcentaje que disminuyó la actividad hemaglutinante inicial que fue de 512 UHA.

## Preparación de los Inmunoestimulantes

La cepa probiótica de levadura, *Debaryomyces hansenii* (cepa, DHHBCS005), obtenida de la Colección de Levaduras Marinas del CIBNOR, fue cultivada en 500 ml del medio YPD-caldo (DIFCO), a 30 °C, por 48 h. La levadura fue suspendida en agua de mar estéril con 0.9% de NaCl y se determinó la concentración utilizando una densidad óptica de 540 nm en colorímetro (Linson 3) hasta llegar a una absorbancia de 1 para obtener una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>. A partir de la concentración obtenida, se realizaron las diluciones requeridas en los bioensayos para utilizar una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>.

Bacterias del género *Bacillus* (*B. teauilensis*, *B. liqueliformis*, *B. endophyticus*), aisladas del intestino de *L. vannamei* (Irasema E. Luis Villaseñor, CIBNOR) fueron cultivadas en 500 mL de caldo marino, a 30°C por 24 h. Las bacterias fueron suspendidas en agua de mar estéril con 0.9% de NaCl y se determinó la concentración utilizando el colorímetro (Linson3) hasta llegar a una absorbancia de 0.7 para obtener una concentración de  $1 \times 10^9$  cel ml<sup>-1</sup>. A partir de la concentración obtenida, se realizaron diluciones requeridas en los bioensayos para utilizar hasta concentración final de  $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> de cada una de las cepas bacterias. Se hicieron dos mezclas de bacterias: Mezcla 1 YC5-2: *Bacillus tequilensis*

( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) y YC3-C *Bacillus liqueliformis* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ); Mezcla 2 YC3-B: *Bacillus endophyticus* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) y C2-2: *Bacillus endophyticus* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ).

Se utilizó la laminarina como inmunoestimulante comercial,  $\beta$ -1,3 glucano, extraída de *Laminaria digitata*, (SIGMA # Cat. L-9634). Las suspensiones de  $\beta$ -1,3 glucano se mezclaron en 10 L de agua de mar para obtener una concentración final de 0.5 mg  $\text{L}^{-1}$ .

### **Cultivo de juveniles de *L. vannamei* tratados con inmunoestimulantes comerciales y *D. hansenni***

Para evaluar la respuesta inmune en juveniles expuestos a inmunoestimulantes, se colocaron grupos de 15 camarones con peso promedio de  $5 \pm 0.1$  g en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 30 L con agua de mar filtrada a  $1 \mu\text{m}$  con aireación constante manejando una temperatura de  $28^\circ\text{C} \pm 0.5$ . Al primer grupo de camarones se le agregó laminarina a una concentración de 0.5 mg  $\text{L}^{-1}$ , al segundo grupo se trató con la mezcla 1 de bacterias a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , el tercer grupo fue tratado con la mezcla 2 a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ , el cuarto grupo se utilizó *D. hansenni* a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  y un quinto grupo se usó como control agregando agua de mar estéril. Todos los tratamientos se agregaron directamente al agua de cultivo cada 3 días. Los camarones fueron alimentados con alimento comercial *ad libitum* una vez al día. El bioensayo tuvo una duración de 14 días, los tratamientos se realizaron por triplicado y se tomaron 3 camarones al azar de cada tratamiento a las 24, 48 y 72 h después de la quinta, tercera y cuarta aplicación de los tratamientos respectivamente para cuantificación de lectina.

### **Obtención de hemolinfa**

A cada camarón se le tomó una muestra de aproximadamente 0.2 ml de hemolinfa de la base del pleópodo del primer segmento abdominal cerca del poro genital. Para evitar la coagulación de la muestra se utilizó una solución anticoagulante (SIC-EDTA), la cual fue diseñada con base a los valores iónicos y osmóticos de la hemolinfa del camarón (450 mM

NaCl, 10 mM KCl, 10mM EDTA-Na<sub>2</sub>, 10mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm kg<sup>-1</sup>) de acuerdo a la técnica descrita por Vargas-Albores *et al.* (1996). Se centrifugó a 800 g por 10 min a 4°C para obtener el plasma, el cual se mantiene en congelación a -20 °C hasta su posterior utilización.

### **Determinación de la concentración de lectina**

Se obtuvieron anticuerpos policlonales de la inmunización de un conejo Nueva Zelanda, hembra de 2 años con los agregados de lectina purificados. La inmunización se realizó cada 8 días por un mes, las dos primeras inmunizaciones de 0.5 ml se llevaron a cabo con adyuvante completo de Freund (0.25 ml) mezclado con 2 mg de agregado en 0.25 ml solución salina al 0.9% y las siguientes inmunizaciones se realizaron con adyuvante incompleto de Freund (0.25 ml) mezclado con 2 mg de agregado de lectina en 0.25 ml de solución salina al 0.9%. Después de una semana de la última inmunización se obtuvieron 50 ml de sangre del conejo, que fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 min recuperando 25 ml de suero. Los anticuerpos fueron precipitados utilizando sulfato de amonio saturado, y fueron marcados con peroxidasa de rábano según el método de Avrameas y Ternynck (1971).

Los anticuerpos se titularon por tablero de ajedrez utilizando diluciones de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800 de éste contra diluciones de 1/10, 1/20, 1/40 y 1/80 del suero de camarón, observándose una absorbancia de 0.300 cuando el anticuerpo estaba a 1/50 y el suero de camarón a 1/10, por lo que se decidió determinar la concentración de lectina utilizando anticuerpos monoclonales contra la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (MrL), los cuales mostraron una absorbancia de 0.686 a una dilución de 1/100 contra el suero de camarón disuelto 1/10.

Para confirmar que los anticuerpos monoclonales de MrL cruzaran con la lectina de *L. vannamei* se realizó un Western blot utilizando agregados de la lectina purificada. La estandarización de la curva se realizó utilizando lectina MrL. La lectina (1-10 µg en 50 µl de buffer de carbonato a 0.1 M, pH 9.5) se fijó en el fondo de cada pozo incubándolo con

50  $\mu$ l de buffer carbonato (0.1 M, pH 9.5) por una hora a 37°C y a 4°C por una noche. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS compuesto por 0.01% Tween 20 (PBS-T); los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con 300  $\mu$ l de PBS que contiene leche descremada incubándolos 90 minutos a 37°C y se lavaron con PBS-T varias veces. Después se agregaron 50  $\mu$ l de anticuerpos marcados con peroxidasa en una dilución de 1:400 y se incubaron por 90 minutos a 37°C, las placas se lavaron exhaustivamente con PBS-T y la reacción fue revelada al añadir 50  $\mu$ l de O-fenilendiamina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 100 mM de bufer de citrato (pH 5.6). La reacción se detuvo al agregar 50  $\mu$ l de 3N HCl y las muestras se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA. El plasma de *L. vannamei* fue diluida 1/10 en 0.1 M de buffer carbonato, pH 9.5 y se fijó al fondo de los pozos incubando con 100  $\mu$ l de buffer carbonato pH 9.5 a 37°C una hora y a 4°C toda la noche, luego las placas se lavaron cuatro veces con PBS-T; los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con 300  $\mu$ l de PBS con leche descremada incubándolos 60 min a 37°C y se lavaron con PBS-T 4 veces. Después se agregaron 100  $\mu$ l de anticuerpos marcados con peroxidasa en una dilución de 1:100 y se incubaron por 90 min a 37°C, las placas se lavaron exhaustivamente con PBS-T y la reacción fue revelada al añadir 100 $\mu$ l de O-fenilendiamina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 100 mM de amortiguador de citratos (pH 5.6). La reacción se detuvo al agregar 100  $\mu$ l de 3N HCl y las muestras se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA.

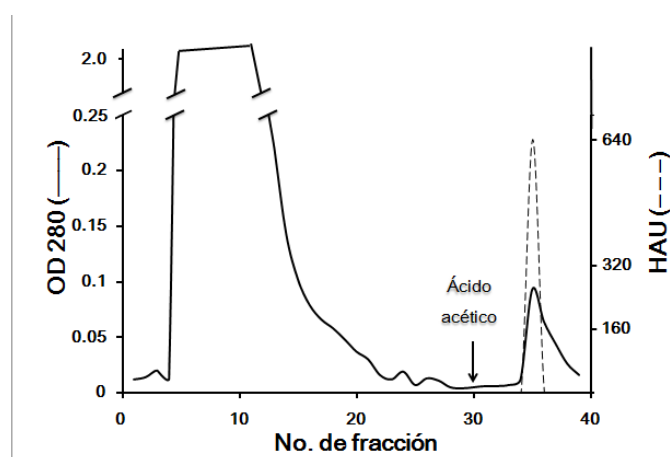
### **Análisis Estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa STATISTICS V9, se hizo la prueba de Kolmogórov-Smirnov para verificar la normalidad de la distribución de los datos y se efectuó la prueba ANOVA para determinar si hubo diferencias significativas entre la concentración de lectina en la hemolinfa de los camarones expuestos a diferentes inmunoestimulantes y el control.

## RESULTADOS

### Aislamiento de lectina por cromatografía de afinidad

Se purificó una lectina de la hemolinfa del camarón blanco (*L. vannamei*) mediante cromatografía de afinidad, en una columna de estroma de eritrocitos de rata (Figura 1). La fracción no retenida no mostró aglutinación de eritrocitos de conejo ni de rata al 2% en solución salina-calcio. Las fracciones retenidas eluidas con ácido acético concentradas y dializadas presentaron aglutinación (Tabla II). Aproximadamente el 90% de la proteína corresponde a la fracción no retenida.



**Figura 1.** Perfil de elución de la lectina de *Litopenaeus vannamei* del suero de los camarones por cromatografía de afinidad utilizando una columna con estroma de eritrocitos de rata. Densidad óptica a 280 nm (línea sólida) y actividad hemaglutinante (línea punteada) en la presencia de eritrocitos de conejo al 2%.

**Tabla II.** Actividad hemaglutinante de las fracciones retenidas. \*UHA: Unidades hemaglutinantes por 1 ml de muestra.

Muestra	UHA* eritrocitos conejo 2% en TBS	UHA* eritrocitos rata 2% en TBS
1 (300 µl)	640	320



### Determinación de proteínas

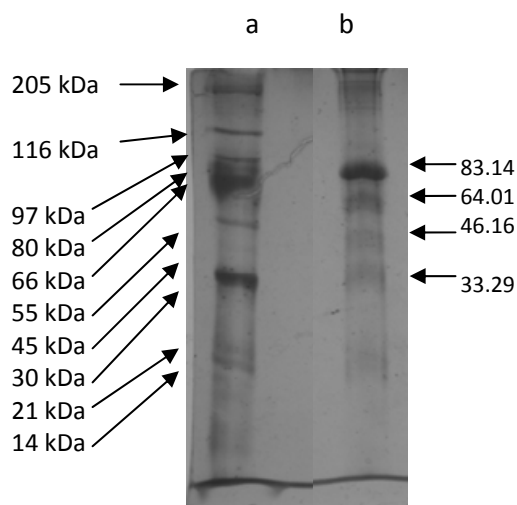
Se determinaron proteínas por el método de Bradford del suero del camarón y de las fracciones no retenidas y retenidas obtenidas de la aplicación de 300  $\mu$ L de suero. Obteniéndose la concentración de proteínas en mg de todas las anteriores excepto de la fracción retenida, ya que la mayoría de la proteína se agregó al momento de concentrar y dializar (Tabla III).

**Tabla III.** Concentración de proteínas en las diferentes etapas de la purificación de lectina de *L. vannamei* contenidas en 300  $\mu$ L de suero.

Fracción	Proteínas mg
Suero	60.47
No retenida	54.33
Retenida	No detectada

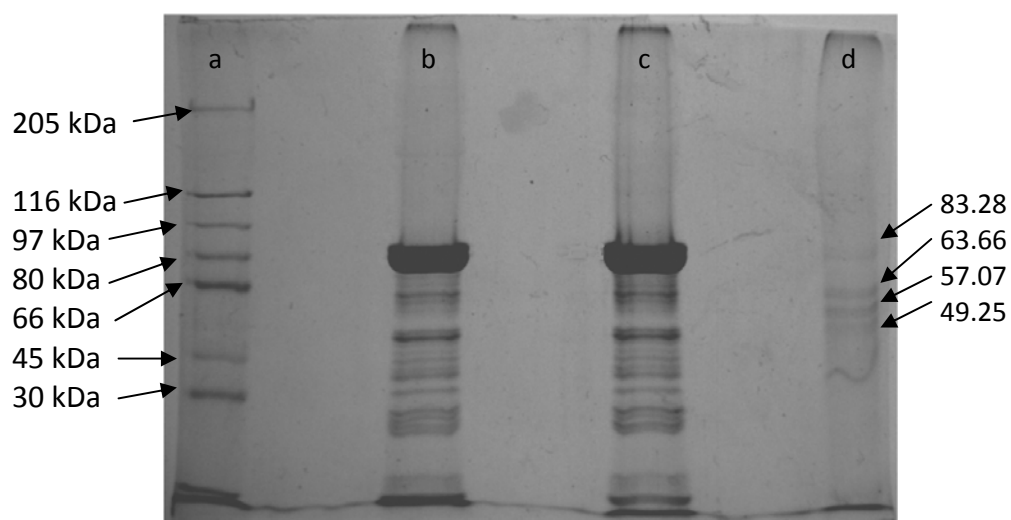
### Determinación del peso molecular de la lectina.

El peso molecular de la lectina se evaluó por electroforesis en gel de poliacrilamida con urea de acuerdo al método descrito por Bollag DM *et al.* (1996) y se tiñó con plata obteniéndose 4 fracciones de 83.14 kDa, 64.01 kDa 46.16 kDa y 33.29. (Figura 2).



**Figura 2.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con urea de la lectina purificada. Carril (a): Marcadores moleculares. Carril (b): lectina purificada de camarón *L.vannamei*.

Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE, según el método descrito por Laemli (1970) y se tiñó con plata observándose las mismas bandas en el suero y fracción no retenida y 4 bandas en la fracción retenida de 83.28 kDa, 63.66 kDa, 57.07 kDa y 49.25 kDa. (Figura 3).



**Figura 3.** Electroforesis SDS-PAGE. Carril (a): Marcadores moleculares. Carril (b): Suero de camarón *L.vannamei*. Carril (c) Fracción no retenida. Carril (d) Lectina de *L.vannamei* purificada.

### Actividad hemaglutinante

El suero del camarón *Litopenaeus vannamei* aglutinó eritrocitos de diferentes especies, el título más alto de hemaglutinación se observó en los eritrocitos de ratón, siendo 8 veces mayor que los demás eritrocitos probados en PBS. La actividad aglutinante aumentó en presencia de  $\text{CaCl}_2$ , de eritrocitos tratados con tripsina y en algunos eritrocitos tratados con sialidasa (Tabla IV).

**Tabla IV.** Actividad hemaglutinante del suero de camarón. Unidades hemaglutinantes (UHA) indican el inverso de la última dilución con actividad hemaglutinante ND: no determinado.

<b>Eritrocitos</b>	<b>Unidades hemaglutinantes (UHA)</b>			
	<b>Nativos (PBS)</b>	<b>Con 5 mM CaCl<sub>2</sub></b>	<b>Tratados con sialidasa</b>	<b>Tratados con tripsina</b>
<b>Conejo</b>	32	1024	2048	16384
<b>Rata</b>	32	128	128	1024
<b>Cuyo</b>	ND	128	128	256
<b>Hámster</b>	ND	16	32	512
<b>Ratón</b>	256	2048	2048	16384
<b>Humano B</b>	32	32	128	2048
<b>Humano O</b>	32	32	128	1024
<b>Humano A</b>	32	32	128	1024

### **Especificidad**

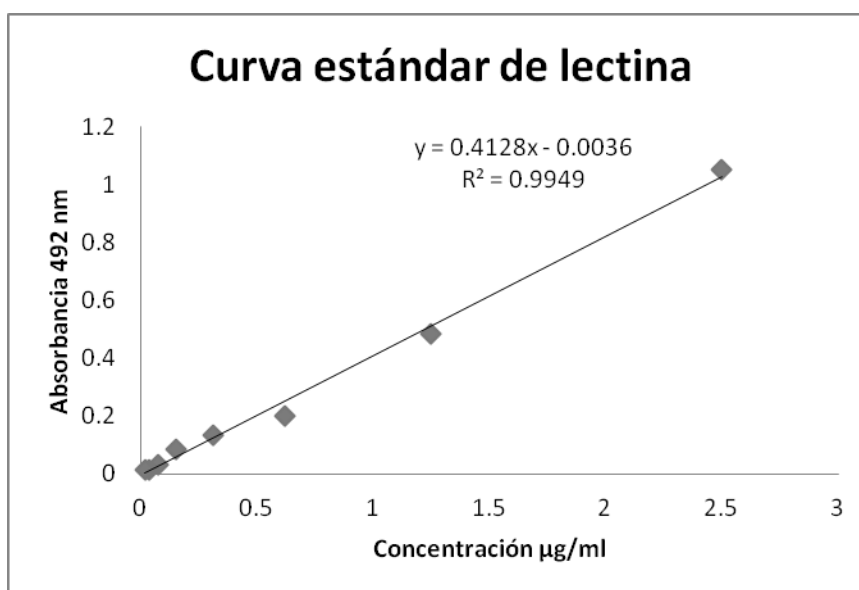
La especificidad se determinó comparando la actividad inhibitoria de varios carbohidratos en la hemaglutinación de los eritrocitos de conejo al 2%. De los 9 monosacáridos evaluados, glucosamina fue el mayor inhibidor al inhibir la aglutinación un 96.8% a 200 mM, mientras que la fucosa tuvo un porcentaje de inhibición de 87.5% y la galactosa y glucosa inhibieron la aglutinación en un 75%. La N-acetil-glucosamina, galactosamina, N-acetil-galactosamina, manosa y manosamina no lograron inhibir la aglutinación a 200 mM (Tabla V).

**Tabla V.** Especificidad de lectina.

<b>Carbohidrato</b>	<b>Porcentaje de inhibición</b>
<b>D-Glucosamina</b>	96.8%
<b>L-Fucosa</b>	87.5%
<b>D-Galactosa</b>	75%
<b>D-Glucosa</b>	75 %

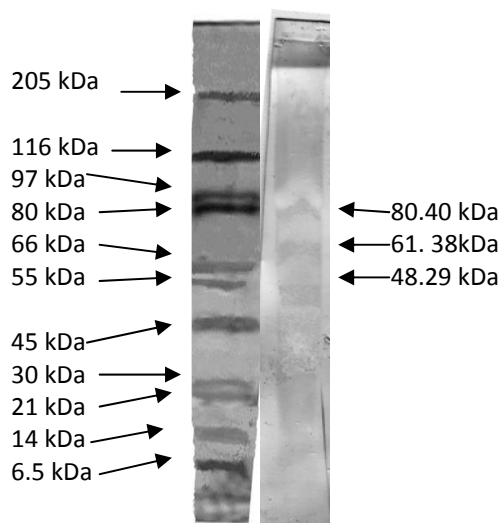
### **Determinación de la concentración de lectina**

Se estandarizó la curva utilizando lectina de *Machrobrachium rosenbergii* (1-10  $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{L}$  de buffer de carbonato a 0.1 M, pH 9.5), obteniéndose una  $R^2$  de 0.99 y una pendiente de 0.4128 (Figura 4).



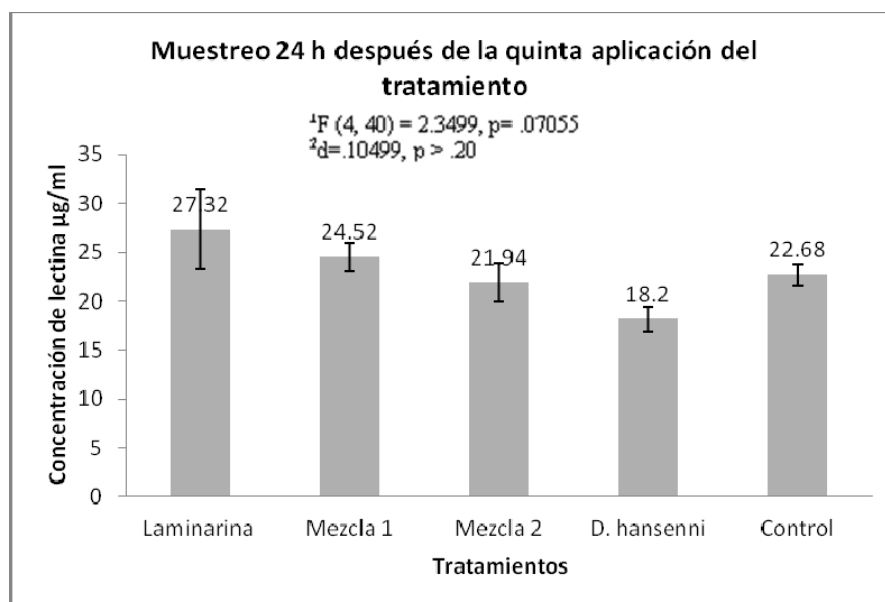
**Figura 4.** Curva estándar de lectina de *Macrobrachium rosenbergii*.

Se realizó un Western blot utilizando agregados de la lectina purificada y anticuerpos contra la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* a una dilución de 1/40, observándose que reconoce 3 (83, 64 y 46 kDa) de las 4 fracciones purificadas. (Figura 5).

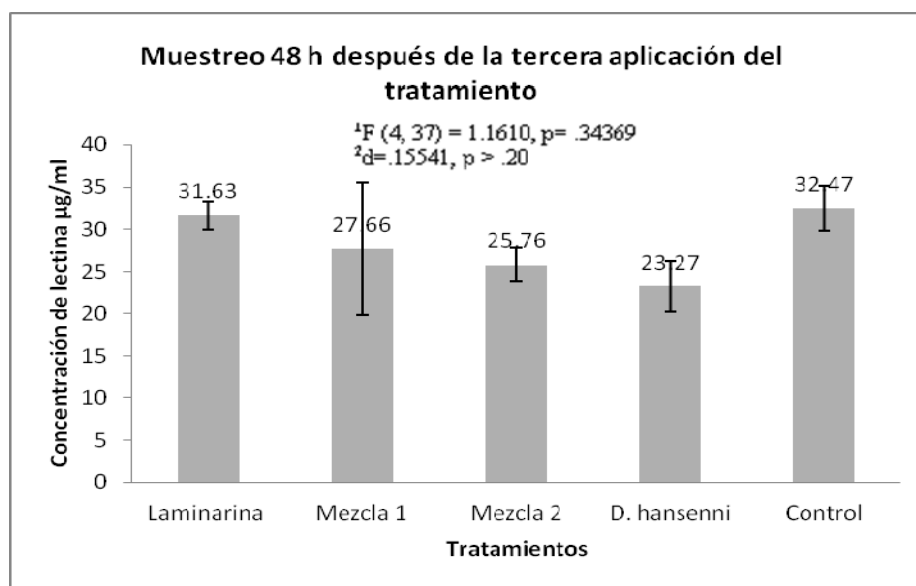


**Figura 5.** Western blot de lectina de camarón *L. vannamei* y anticuerpos contra MrL

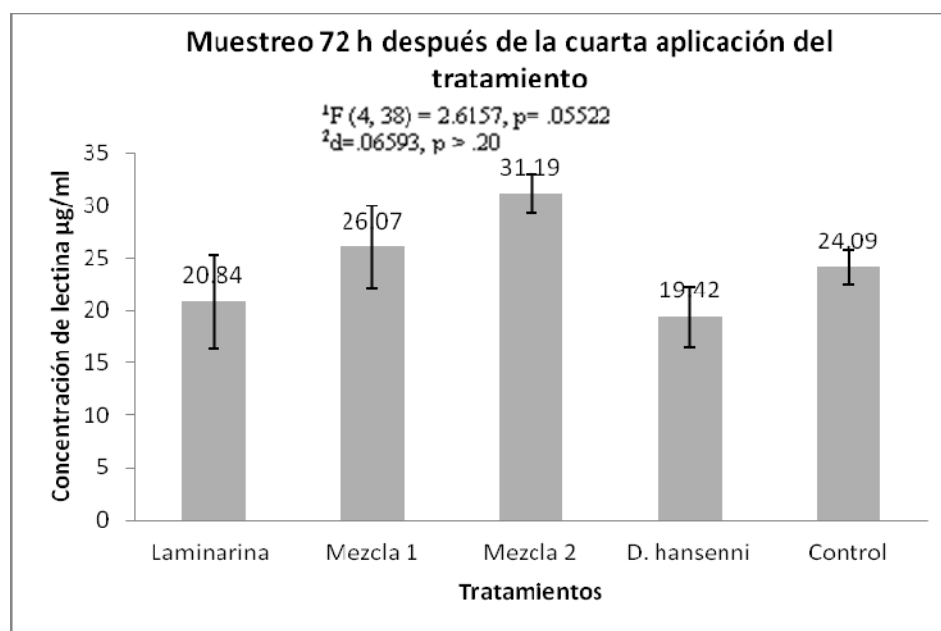
La concentración de lectina de los camarones tratados se determinó por ELISA utilizando anticuerpos monoclonales contra MrL y el plasma de camarón. El análisis de ANOVA no mostró diferencias significativas entre la concentración de lectina en la hemolinfa de los camarones *L. vannamei* expuestos a diferentes tratamientos y el control. La concentración de lectina se mantuvo entre 18.2 y 32.4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (Figura 6, 7 y 8).



**Figura 5.** Muestreo realizado 24 h después de la quinta aplicación del tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. <sup>1</sup> Prueba de ANOVA  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. <sup>2</sup> Prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $p > 0.20$  indica una distribución normal.



**Figura 6.** Muestreo realizado 48 h después de la tercera aplicación del tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. <sup>1</sup>Prueba de ANOVA  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. <sup>2</sup>Prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $p > 0.20$  indica una distribución normal.



**Figura 7.** Muestreo realizado 72 h después de la cuarta aplicación del tratamiento. Las barras verticales indican el error estándar. <sup>1</sup> Prueba de ANOVA  $p < 0.05$  indica diferencias significativas. <sup>2</sup> Prueba de Kolmogórov-Smirnov,  $p > 0.20$  indica una distribución normal.

## DISCUSIÓN

Los invertebrados no presentan una respuesta inmune adaptativa para combatir a los agentes extraños, por lo que aparentemente carecen de una especificidad y memoria inmunológica. Sin embargo, poseen lectinas que son proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza y tienen la capacidad de reconocer de manera específica carbohidratos en la superficie celular, desencadenando diferentes mecanismos de defensa como son: activación del estallido respiratorio, inducción del sistema profenoloxidasa, aglutinación, fagocitosis mediada por opsonización y encapsulación de virus, bacterias y hongos, además algunas lectinas pueden presentar actividad antimicrobiana (Xian-Wei *et al.*, 2012). Así mismo, se ha sugerido que las lectinas podrían ser los precursores funcionales de los anticuerpos en vertebrados, ya que muestran una gran especificidad por ciertos carbohidratos y porque están involucradas en el reconocimiento y eliminación de patógenos (Vázquez-Moreno *et al.*, 1998).

En este estudio se purificó lectina de la hemolinfa del camarón blanco (*L. vannamei*) mediante la cromatografía de afinidad en una columna de estroma de eritrocitos de rata, donde la fracción no retenida comprendió el 90% de las proteínas presentes en el suero del camarón. Probablemente la mayor parte de la fracción no retenida corresponde a la hemocianina ya que en el camarón *L. vannamei* la hemocianina representa del 80 al 95% de las proteínas totales de su hemolinfa (Vázquez-Moreno *et al.*, 1997). Sin embargo al momento de concentrar y dializar la lectina obtenida se agregó, por lo que no fue posible evaluar su peso molecular en condiciones nativas, por lo tanto es difícil saber si se trata de una o de varias lectinas purificadas. En condiciones desnaturalizantes (gel urea) se obtuvieron cuatro fracciones de 83, 64, 46 y 33 kDa. Sun *et al.* (2007) purificaron una lectina del plasma de *L. vannamei*, que presentó un peso molecular de 172 kDa y está compuesta por subunidades de 32 y de 38 kDa. También se han caracterizado diversas lectinas del camarón *L. vannamei* mediante métodos moleculares, como las lectinas recombinantes LvLec (Zhang *et al.*, 2009), LvLec1 (Luo *et al.*, 2011) y LvCTL1 (Zhi-Ying *et al.*, 2009); que al correrlas en un gel SDS-PAGE al 15% presentaron un peso molecular

de 25, 18.8, 15.86 kDa respectivamente. Así mismo, se han purificado lectinas de varias especies de camarones peneidos que difieren en su peso molecular, número y tamaño de sus subunidades. La lectina de la hemolinfa de *P.californiensis* (BSH-1) tiene un peso molecular de 175 kDa, constituida por subunidades de 41 kDa; la lectina del suero de *P. monodon* (monodina) es una proteína de 420 kDa, compuesta por subunidades de 27 kDa, en *P. paulensis* se purificó una lectina de la hemolinfa de un peso molecular de 153 kDa, formada por subunidades de 31 kDa; *P. japonicus* tiene una lectina de 330 kDa, compuesta por subunidades de 33 kDa, en *P. stylirostris* se encontró una lectina de 30 kDa (Freire Marques y Barracco, 2000) mientras que en *P. shmitti* (Freire-Marques y Barracco, 2000) y *L. setiferus* (Alpuche *et al.*, 2005), presentan lectinas heterooligoméricas, ya que la primera es una proteína de 153 kDa, con subunidades de 31 y 34 kDa y la última tiene un peso molecular de 291 kDa formada por cuatro subunidades, dos de 80 y dos de 52 kDa. Con lo anterior podemos ver que las lectinas de *L. vannamei* al igual que la de otras especies de camarón presentan variabilidad en el peso molecular de sus subunidades y que puede presentar una o varias subunidades, por lo que según los pesos moleculares obtenidos en el gel no podemos saber si es una lectina con varias subunidades o son varias lectinas de diferente peso molecular.

La hemolinfa de *L. vannamei* tiene mayor actividad aglutinante en presencia de eritrocitos de ratón. La superficie de los eritrocitos de ratón presenta una gran cantidad de residuos O-acetilados (60% del total de sus residuos de ácido siálico) provenientes principalmente del ácido siálico 9-O-acetil neuramínico (Neu5,9Ac); mientras que los eritrocitos de rata y conejo tienen un menor porcentaje de derivados O-acetilados (40% y 20% del total de residuos de ácido siálico) (Shukla *et al.*, 1982) y los eritrocitos de los humanos presentan ácido neruamínico y no cuentan con Neu5,9Ac (Krotkiewski *et al.*, 1988), por lo tanto se puede decir que los derivados O-acetilados tienen un papel importante en el reconocimiento de la lectina presente en la hemolinfa. En general varias lectinas de diferentes camarones presentan una alta especificidad para los carbohidratos N-acetilados, principalmente para el ácido neuramínico como es en el caso de las lectinas LVL (*L. vannamei*) (Sun *et al.*, 2007) y FC-L (*Fenneropenaus chinensis*) (Sun *et al.*, 2008), las cuales son inhibidas con muy



bajas concentraciones de este monosacárido (0.125 y .25 mM, respectivamente). Sin embargo, también hay lectinas que tienen una mayor especificidad para los residuos O-acetilados como en caso de la lectina de *Cancer antennarius* que es específica para los ácidos siálicos 9-O y 4-O acetilados (Ravindranath MH *et al.*, 1985), o la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (Vázquez-Moreno *et al.*, 1993) y *Liocarcinus depurator* (Fragkiadakis *et al.*, 1997) que reconocen el Neu5,9Ac. No obstante, podemos observar que al tratar los eritrocitos con sialidasa la aglutinación permanece igual o aumenta, probablemente debido a que al hidrolizar los enlaces de ácido siálico se exponen más residuos de galactosa en los eritrocitos de las diferentes especies (Krotkiewski , 1998), demostrándose especificidad de la lectina hacia este monosacárido. Esta especificidad hacia la galactosa se ha visto en otras lectinas de camarones como la lectina PmLec de *P. monodon* (Luo *et al.*, 2006) y la lectina recombinante LvLec1 de *L.vannamei* (Luo *et al.*, 2011), que reconocen galactosa y glucosa pero no sus derivados acetilados. Todo lo anterior sugiere que la hemolinfa presenta una lectina con diversos mecanismos de regulación en base a organización estructural o la hemolinfa podría tener diferentes lectinas o isoformas de lectinas con diversas especificidades y posiblemente distintas funciones, como se ha visto en las lectina LvCTLbr1 y LvCTLbr2 de *L.vannamei*, las cuales difieren en 5 residuos en las posiciones 29, 91, 109, 150 y 330, donde la sustitución de treonina por alanina (posición 150) en el CRD1 de LvCTL-br1 y el aspartato por glicina (posición 109), ocasiona un menor número de puentes de hidrógeno en el CRD1 de LvCTL-br2, provocando una interacción química más débil entre los residuos del sitio de unión LvCTL-br2, CRD1 y el azúcar correspondiente, afectando la afinidad de las proteínas por los carbohidratos (Costa *et al.*, 2011) En juveniles de *Macrobrachium rosenbergii*, se encontraron 4 isoformas de lectina, de las cuales las lectinas formadas por subunidades en un pI de 5.6 mostraron una menor actividad hemaglutinante (Zenteno *et al.*, 2000).

Al tratar los eritrocitos de las diferentes especies con tripsina, aumenta el título de aglutinación, probablemente debido a que la tripsina hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas dejando más expuestos a los glicolípidos de la superficie de los eritrocitos que en su mayoría tienen como carbohidrato terminal a la galactosa. Los eritrocitos de conejo

tienen una gran cantidad de macro glicolípidos en su membrana, que pueden representar 1/3 de la fracción glicoproteica y el carbohidrato terminal de la mayoría de las cadenas de carbohidratos de los glicolípidos es la galactosa (Krotkiewski *et al.*, 1988; Galili *et al.*, 2010). En los eritrocitos de los humanos, aproximadamente el 26% de las cadenas de carbohidratos de los glicolípidos terminan en galactosa y otras en menor proporción cuentan con fucosa (Greer *et al.*, 2009). Un fenómeno similar sucede con la lectina LVL de *L. vannamei* (Sun *et al.*, 2007) y la lectina de *M. rosebergii* (Vázquez-Moreno *et al.*, 1993) donde aumenta la actividad aglutinante de los eritrocitos tratados con tripsina o proteasa.

En la inhibición de la hemaglutinación con diferentes carbohidratos observamos que existe una mayor especificidad por la glucosamina, lo que indica que la lectina presente en el suero podría estar participando mayormente en el transporte de glucosamina para la formación de la quitina de la cutícula (Cuzon *et al.*, 2000). Igualmente hay una especificidad por la fucosa, galactosa y glucosa. La especificidad por la fucosa también se ha observado en la lectina tachylectin-4 de *Tachypleus tridentatus*, que presenta una alta afinidad por la cepa lisa de *Escherichia coli* O111:B4, debido a que en el extremo de su antígeno O tiene a la colitosa (3-deoxi-L-fucosa), la cual muestra una estructura similar a la L-fucosa (Saito *et al.*, 1997). Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento de la lectina hacia la galactosa y glucosa es compartido por las lectinas LvLec1 (Luo *et al.*, 2011) y por la lectina PmLec de *P. monodon* (Luo *et al.*, 2006). La galactosa se encuentra principalmente en los lipopolisacáridos de las bacterias Gram- como *Listonella anguillarum* y en la envoltura de algunos virus (Wei *et al.*, 2012). Los lipopolisacáridos de las bacterias Gram- varían en su grado de acilación y glicosilación (Raetz *et al.*, 2002), por lo que la especificidad de la lectina por los diferentes monosacáridos (glucosa, galactosa y fucosa) sugiere que ésta podría tener una función importante en el reconocimiento de bacterias Gram-.

También podemos observar que la aglutinación de la hemolinfa aumenta al agregar 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, lo que sugiere que las lectinas presentes en la hemolinfa son lectinas tipo C, que

requieren del calcio para su funcionamiento, ya que el calcio actúa como puente entre la proteína y el azúcar por medio de interacciones directas con los grupos hidroxilo del azúcar (Macarulla *et al.*, 2008).

En este estudio no encontramos diferencias significativas entre la concentración de lectina en la hemolinfa de los camarones *L. vannamei* expuestos a diferentes tratamientos y el control. Los inmunoestimulantes usados en el bioensayo pueden clasificarse en peptidoglicanos (*Bacillus*) y  $\beta$ -1,3 glucanos (laminarina y *D.hanseni*) en base a los componentes antigénicos de su pared celular.

Los glucanos han sido ampliamente utilizados como inmunoestimulantes para aumentar la resistencia de los crustáceos contra las enfermedades virales y se han realizado varios estudios sobre el efecto de los  $\beta$ -1,3 glucanos en algunos factores de la respuesta inmune innata de los camarones (Sarlin y Philip, 2011; Sukumaran *et al.*, 2010; Campa-Cordova, *et al.*, 2005). Los peptidoglicanos están presentes en la pared celular de las bacterias Gram+ y han tenido éxito al ser utilizados como inmunoestimulantes en los camarones. Además en varias investigaciones se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* pueden estimular la respuesta del sistema inmune y/o la resistencia al virus de la mancha blanca (Zhan *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Rengpiptat *et al.*, 2000)

Sin embargo poco son los estudios sobre el efecto de los  $\beta$ -1,3 glucanos y de los peptidoglicanos en las lectinas, como el realizado por Pais *et al.* (2008), donde se demuestra que la actividad hemaglutinante (eritrocitos de ratón) de la hemolinfa del *P. monodon* aumenta 24 h después del tratamiento por inmersión (0.15 mg ml<sup>-1</sup>) o 72 h después de su última alimentación (0.2% en alimento por 3 días) con glucanos obtenidos de *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, Sritunyalucksana *et al.* (1999), encontraron que al utilizar 0.4% de peptidoglicano o 0.8% de laminaria en la fracción lisada de los hemocitos del camarón no afectó el título de aglutinación, lo cual concuerda con otro estudio realizado donde la incubación *in vitro* del suero y del lisado de los hemocitos de *Carcinus maenas*

con 0.2% de laminarina no causó cambios en la actividad hemaglutinante con respecto al control (Smith *et al.*, 1983).

Es importante considerar que los estudios que fallaron en aumentar la aglutinación fueron estudios *in vitro* y fueron realizados con la fracción lisada de los hemocitos, lo que imposibilita el funcionamiento de los hemocitos u otros factores que pudieran estar involucrados en la estimulación de la producción de lectinas. La síntesis de lectinas ha sido atribuida a diferentes órganos en los crustáceos, en *M. ronsebergii* la lectina parece ser sintetizada por los hemocitos, ya que ésta se ha encontrado en sus gránulos y retículo endoplasmático (Vázquez-Moreno *et al.*, 1997). Sin embargo, en un estudio realizado por Fragkiadakis y Stratakis (1997), se demostró por estudios de señalamiento *in vitro* que la lectina del cangrejo *L. depurator* se sintetiza en el hepatopáncreas a pesar de su presencia dentro de los granulocitos de cangrejo. Entonces al utilizar solamente el lisado de hemocitos se impide la producción de lectinas, obteniéndose los mismos resultados de aglutinación que los de control.

En el presente estudio tampoco se detectó un incremento en la concentración de lectina al tratar a los camarones *L. vannamei* con laminarina ( $0.5\text{mg L}^{-1}$ ) con *D. hansenii* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ) o con las diferentes mezclas de *Bacillus* ( $1 \times 10^6$  cel  $\text{ml}^{-1}$ ), lo que sugiere que no se está estimulando adecuadamente el proceso de activación y síntesis de lectina en los hemocitos o en las células del hepatopáncreas. Sin embargo, para poder interpretar estos resultados hay que considerar que las levaduras podrían cambiar de fenotipo estructural de glucanos y que la actividad inmunoestimulante de los glucanos está influenciada por su grado de ramificaciones, tamaño y estructura molecular (Soltanian *et al.*, 2009; Gorocica *et al.*, 2009). Además, los efectos inmunoestimulantes de los glucanos y peptidoglucanos han mostrado ser diferentes en relación a su procedencia, especie animal, etapa de desarrollo del organismo, dosis, ruta, tiempo de administración y su utilización junto con otros inmunoestimulantes (Soltanian *et al.*, 2009).

Se debe tener cuidado con la dosis, ya que una dosis alta puede causar pérdida de energía resultando en una inmunosupresión (Soltanian *et al.*, 2009). En un estudio realizado por Li *et al.* (2009), se vio que los efectos positivos de los peptidoglucanos sobre el sistema inmune disminuyen significativamente cuando aumentan la dosis de  $10^8$  CFU  $g^{-1}$  a  $10^{10}$  CFU  $g^{-1}$ , por lo que se concluye que dosis altas de estos pueden inhibir la respuesta inmune en lugar de estimularla. Por lo tanto es importante investigar la dosis de inmunoestimulante que pueda estimular el sistema inmune y que no ocasione un gasto energético importante.

Se esperaba que *D. hansenii* tuviera un mayor efecto sobre la lectina de *L. vannamei* que el efecto observado en el estudio de Pais R *et al.*, 2008 de los glucanos de *S. cerevisiae* sobre las lectinas de *P.monodon*, ya que se ha visto que las levaduras marinas ofrecen mayor protección a los camarones que *S. cerevisiae* cuando son retados contra el virus de la mancha blanca, causando una mayor estimulación de algunos factores de la inmunidad innata del camarón como son el número de hemocitos, la fenoloxidasa y el anión superóxido (Sarlin *et al.*, 2011). Además se ha sugerido que las levaduras marinas (*D.hansenii* y *C. albicans*) tienen un mayor efecto inmunoestimulante en comparación a *S. cerevisiae* debido a que tienen un mayor contenido de  $\beta$ -1,3 glucanos en la pared celular (16.48% aproximadamente), un mayor peso molecular, un menor número de ramificaciones y son ricas en minerales, los cuales se ha reportado que juegan un papel importante en la estimulación de la inmunidad en peces y moluscos (Sarlin *et al.*, 2011; Sukumaran *et al.*, 2010; Pipe *et al.*, 1995; Landolt *et al.*, 1989). Sin embargo, como se mencionó anteriormente también se ha observado que algunas levaduras pueden cambiar de fenotipo estructural de los glucanos, como en el caso de algunas cepas de *Histoplasma capsulatum*, las cuales espontáneamente producen variantes avirulentas que carecen de  $\alpha$ -1,3-glucano. Se sabe que la inmunoestimulación de las levaduras está dada principalmente por la presencia de  $\beta$ -1,3 glucanos en su pared celular, por lo tanto si el fenotipo de éstos cambia, probablemente su efecto inmunoestimulante será diferente al esperado (Gorocica *et al.*, 2009).

En cuanto a la vía de administración de los inmunoestimulantes, muchos autores han reportado que la administración por inyección es la más eficaz, sin embargo es poco práctica, costosa y ocasiona un estrés adicional al cultivo de camarón, por lo que se prefiere la administración por inmersión o en la dieta (Smith *et al.*, 2003). Además en algunos casos se ha visto que la administración por inmersión puede mejorar la respuesta inmune en el camarón (Alabi *et al.*, 1999). En esta investigación se utilizó la administración por inmersión y no aumentó la concentración de lectinas en los camarones tratados, sin embargo harían falta más estudios para poder determinar si la vía de administración empleada pudo haber influido en los resultados, ya que difiere a lo obtenido por Pais *et al.* (2008) donde la hemaglutinación de los eritrocitos de ratón por el suero del camarón aumentó 24 h después de haber tratado por inmersión a *P. monodon* con glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*, sugiriendo que las lectinas de la hemolinfa del camarón pueden ser estimuladas por este método.

También se observa que la duración del tratamiento de los camarones con inmunoestimulantes antes de medir los parámetros inmunológicos o realizar retos contra patógenos varía mucho con cada investigación realizada. Por lo tanto, se reportan casos en los que un parámetro aumenta 24 h después de aplicar un sólo tratamiento, como el aumento de la hemaglutinación de los eritrocitos de ratón en el camarón *P. monodon* (24 h) (Pais *et al.*, 2008), o el aumento de la SOD en *L. vannamei* (48 h) (Campa-Córdova, 2005); y casos en que se observa el incremento de algún factor inmunológico después de varios días de tratamiento como en el estudio con *L. vannamei* donde se observa un aumento de la catalasa y lisozima 84 días después de su tratamiento diario con glucanos (Hong-Xia *et al.*, 2011), o como en la investigación realizada con la postlarva 10 de *P. monodon* donde la fenoloxidasa incrementa 90 días después de su tratamiento diario con *Bacillus* (Rengipat *et al.*, 2000). Por lo que hacen falta más estudios para establecer si el tiempo de administración de los inmunoestimulantes usados en esta investigación pudo haber afectado los resultados.

En este trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la lectina de *M. rosebergii* (MrL) para determinar la concentración de lectina. Los anticuerpos monoclonales tienen una alta especificidad, sin embargo algunos anticuerpos monoclonales de gran afinidad presentan reactividad cruzada. En una investigación realizado por Pereyra *et al.* (2009) se demostró que los anticuerpos monoclonales anti MrL presentan reactividad cruzada con proteínas presentes en la hemolinfa de *Procambarus clarkii*, *Procambarus americanus*, *Litopenaeus setiferus* y *Pseudohelphusa americana*, y sus resultados sugirieron que los anticuerpos reconocen el sitio activo de la lectina de estas especies. En la inmunoelectrotransferencia, se identificó que los anticuerpos pueden reconocer 3 (83, 64 y 46 kDa) de las 4 fracciones de lectina purificada de *L. vannamei* por lo que se estaría reconociendo un 75% de lectina presente en la hemolinfa, lo que significa que la lectina de *M. rosebergii* y *L. vannamei* comparten epítopes comunes, posiblemente debido a que las lectinas de estos crustáceos estén evolutivamente bien conservadas.

## CONCLUSIONES

Se purificó lectina de la hemolinfa del camarón blanco (*L. vannamei*) mediante la cromatografía de afinidad en una columna de estroma de eritrocitos de rata, sin embargo debido a que se agregó es difícil concluir si se trata de una lectina con varias subunidades o de varias lectinas con diferente peso molecular.

La especificidad de la lectina o lectinas presentes en el suero indica que podría estar involucrada en el transporte de glucosamina para la formación de quitina y en el reconocimiento de los LPS de las bacterias Gram-, para desencadenar una respuesta inmune. También sugiere que la hemolinfa presenta una lectina con diversos mecanismos de regulación en base a su organización estructural o que la hemolinfa podría tener diferentes lectinas o isoformas de lectinas con diversas especificidades y posiblemente distintas funciones.

Las lectina o lectinas presentes en el suero son  $\text{Ca}^{++}$  dependientes por lo que están dentro del grupo de las lectinas tipo C.

En el estudio realizado no se detectó un incremento en la concentración de lectina al tratar a los camarones *L.vannamei* con laminarina (0.5mg/L), con *D. hansenii* ( $1 \times 10^6$  cel/ml) o con las diferentes mezclas de *Bacillus* ( $1 \times 10^6$  cel/ml), lo que sugiere que no se está estimulando adecuadamente el proceso de activación y síntesis de lectina en los hemocitos o en las células del hepatopáncreas, sin embargo hay varios factores que pudieron afectar los efectos inmunoestimulantes de los glucanos y peptidoglucanos usados en este trabajo como son su procedencia, que la levadura pudiera haber tenido un cambio de fenotipo estructural de sus glucanos, la dosis de inmunoestimulante empleada, la ruta y el tiempo de su administración.

Los anticuerpos contra la lectina de *M.rosebergii* pueden reconocer la lectina purificada de *L. vannamei*, lo que significa que la lectina de *M. rosebergii* y *L. vannamei* comparten



epítopes comunes, posiblemente debido a que las lectinas de estos crustáceos estén evolutivamente bien conservadas.

## LITERATURA CITADA

1. Aguirre-Guzmán G, Sánchez-Martínez JG, Campa-Córdova AI, Luna-González A, Ascencio F. 2009. Penaeid Shrimp Immune System. *Thai J.Vet.Med.* 39:205-215.
2. Alabi AO, Jones DA, Latchford JW. 1999. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture.* 178(1-2):1-11
3. Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, Rosas C, Pascual C, Slomianny MC, Vázquez L, Zenteno E. 2005. Purification and characterization of a lectin from the White shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochim. Biophys. Acta.* 1724: 86-93
4. Alpuche J, Pereyra M, Vazquez L, Agundis C, Rosas C, Zenteno E. 2005. Análisis proteómico de la subunidad LsL1 de la lectina del Camarón Blanco del Golfo de México *Litopenaeus setiferus*. *Rev. Elect. Vet.* VI:1-10.
5. Anggraeni MS, Owens L. 2000. The haemocytic origin of lymphoid organ spheroid cells in the penaeid prawn *Penaeus monodon*. *Dis. Aquat. Org.* 40: 85-92.
6. Bio-Rad Silver Stain. Consultado el 15 de noviembre del 2011. [http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin\\_9057.pdf](http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9057.pdf).
7. Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. 1970. *Protein methods.* Wiley-Liss, 1996.
8. Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
9. Campa-Córdova AI, Hernández-Saavedra NY, Guzmán-Aguirre G, Ascencio F. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas.* 31: 661-669
10. Chang CF, Su MS, Chen HY, Liao IC. 2003. Dietary  $\beta$ -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Panaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15:297-310.

11. CONAPESCA. 2001. Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco.14:1-10.
12. CONAPESCA. Apoya Sagarpa-Conapesca a la región Mar de Cortés con 4,450 MDP. 2011. Consultado el 27 de abril del 2012. .{HYPERLYNK [http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/11\\_de\\_mayo\\_de\\_2011\\_hermosillo\\_son/\\_rid/8022/\\_mto/3/\\_wst/maximized?imp\\_act=imp\\_step3&page=0](http://www.conapesca.gob.mx/wb/cona/11_de_mayo_de_2011_hermosillo_son/_rid/8022/_mto/3/_wst/maximized?imp_act=imp_step3&page=0)}
13. Costa FHF, Valenca NSMS, Siva ARBP, Bezerra GA, Cavada BS, Rádis-Baptista G. 2011. Cloning and molecular modeling of *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) C-type lectin homologs with mutated mannose binding domain-2. Gen. Mol. Res. 10: 650-664.
14. Cuzon G, Rosas C, Gaxiola G, Taboada G Wormhoudt V. Utilization of Carbohydrates y shrimp. 2000. In: Cruz-Suárez, L.E, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA y Civera-Cerecedo R (eds). Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V simposium internacional de nutrición acuícola. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán.
15. Fragkiadakis G, Stratakis E. 1997. The lectin from the crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetylsialic acids. Comp. Biochem. Physiol. 117B: 545-552.
16. Freire, M. R, y M. A. Barracco. 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. Aquaculture 191: 23-44.
17. Galili U, Albertin MR, Sondel PM, Wigglesworth K, Sullivan M, Whalen GF. 2010. In Situ Conversion of Melanoma Lesions into Autologous Vaccine by Intratumoral Injections of  $\alpha$ -gal Glycolipids. Cancers. 2: 773-793.
18. Gorocica P, Taylor ML, Alvarado-Vásquez N, Pérez-Torres A, Lascurain R, Zenteno E. 2009. The interaction between *Histoplasma capsulatum* cell wall carbohydrates and host components: relevance in the immunomodulatory role of histoplasmosis. Mem Inst Oswaldo Cruz,; 104: 492-496.
19. Greer JP. 2009. Wintrobe's Clinical hematology. Volumen 1. 12 ed. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. USA.

20. Hong-Xia Z, Jun-Ming C, An-Li W, Zhen-Yu D, Chao-Xia Y, Yan-Hua H, Han-Bing L, Ting-Ting Z, Guo-Li L. 2012. Effect of long-term administration of dietary B 1,3 glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquacult Int.* 20:145-158.
21. Itami T. 2002. Promising strategies against WSSV for kuruma shrimp in Japan. *Asian Aquaculture.* 24: 9-10
22. Kang KS, Deng FL, Ming ZC, Hai YJ, Ling RW, Xun X. 2010. Cloning and characterization of three novel WSSV recognizing lectins from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28: 596-603
23. Krotkiewski H. 1988. Minireview. The Structure of Glycophorins of Animal Erythrocytes. *Glyconconj. J.*;5: 35-48
24. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*227: 680-685
25. Landolt ML. 1989. The relationship between diet and the immune response of fish. *Aquaculture.* 79:193-206.
26. Li J, Tan B, Mai K. 2009. Dietary probiotic *Bacillus OJ* and isomaltooligosaccharides influence the intestine microbial populations, immune responses and resistance to white spot syndrome virus in shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture.* 291:35-40.
27. Liu H, Söderhäll K, Jiravanichpaisal P. 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish Shellfish Immunol.* 27:79-88.
28. Luo T, Yang H, Li F, Zhang X, Xu X. 2006. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Dev. Comp. Immunology.* 30: 607-617.
29. Luo Z, Zhang J, Li F, Zhan X, Liu C, Xiang J. 2011. Identification of a novel C-type from the shrimp *Litopenaeus vannamei* and its role in defense against pathogens infection. *Chinese J. of Oceanol. Limnol.* 29: 942-951
30. Ma TH, Tiu SH, He JG, Chan SM. 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.

31. Macarulla JM. 2008. Bioquímica. Editorial Reverté, S.A. España.
32. Morales-Covarrubias MS. 2010. Enfermedades del Camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas. México.
33. Ochoa JL, Kristlansen T. 1978. Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. FEBS LETTERS. 90: 145-148.
34. Pais R, Khushiramani R, Karunasagar I, Karunasagar I. 2008. Effect of immunostimulants on the haemolymph haemagglutinins of tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture Res.. 39: 1339-1345.
35. Pei-Feng J, Cui-Luan Y, Zhi-Yong W. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. Fish Shellfish Immunol. 27:563-570.
36. Peraza-Gómez V, Luna González A, Campa-Córdova AI, López-Meyer M, Firro-Coronado JA, Álvarez-Ruiz P. 2009. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture Res. 40: 1481-1489.
37. Pereyra A, Agundis C, Barrera B, Alpuche J, Sierra C, Zenteno R, Zenteno E, Vazquez L. 2009. The use of monoclonal antibodies anti-lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879) in the recognition of protein with lectin activity in decapod's hemolymph. Prep. Biochem. Biotechnol. 39: 308-322.
38. Philipp EER, Lipinski S, Rast J, Rosestiel P. 2011. Immune defense of marine invertebrates: the role of reactive oxygen and nitrogen species. En: Abele D, Vázquez-Medina JP, Zenteno-Savín T (eds.) Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 236-245
39. Pipe RK, Coles JA, Thomas ME, Fossato VU, Pulsford AL. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. Aquatic Toxicology. 32: 59-73.
40. Purivirojkul W, Areechon N, Srisapoom P. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Kasetsart J. (Nat.Sci.).40:11-187

41. Raetz CRH, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu.Rev. Biochem.*71: 635-700
42. Ravindranath MH, Higa HH, Cooper EL, Paulson JC. 1985. Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* 260: 8850-8856.
43. Rengpipat S, Rukpratamporn S, Piyatiratitivorakul S, Menasaveta P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (Bacillus S11). *Aquaculture.* 191: 271-288
44. Reyes Moreno JL, Tellez Castañeda M, González Sánchez JA. 2009 Situación actual y perspectivas del camarón en México. FIRA Boletín Informativo. Dirección General Adjunta de Inteligencia Sectorial. Subdirección de Comunicación Institucional. México.
45. SAGARPA. Acuerdo mediante el cual se aprueba la actualización de la Carta Nacional Acuícola. 2012. Consultado el 24 de agosto del 2012. {HYPERLYNK <http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/2011/06062012%20SAGARPA.pdf>}
46. SAGARPA. Registra Balanza Comercial del sector pesquero superávit de 153.3%.2010. Consultado el 2 de diciembre del 2010. <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/Paginas/2010-B002.aspx>
47. Saito T, Hatada M, Iwanaga S, Kawabata S. 1997. A Newly Identified horseshoe Crab Lectin with Binding Specificity to O-antigen of Bacterial Lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 272: 30703-30708
48. Sánchez A, Mendoza F, Hernández A, Galván E. El síndrome de la mancha blanca. 2008. Consultado el 2 de diciembre del 2010. {HYPERLYNK [http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/244/Articulos/Virus\\_gran\\_amena za/VirusCamaron2.html](http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/revista/244/Articulos/Virus_gran_amena za/VirusCamaron2.html)}
49. Sarlin PJ, Philip R. 2011.Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: A comparative study. *Aquaculture.* 321:173-178.

50. Shukla AK, Shauer RS. 1982. Fluorimetric Determination of Unsubstituted and 9(8)-O-Acetylated Sialic Acids in Erythrocyte Membranes. *Physiol. Chem.* 363: 255-262.
51. Smith VJ, Brown JH, Hauton C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish Shellfish Immunol.* 15: 71-90
52. Smith VJ, Soderhall K. 1983. B-1,3 glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biol. Bull.* 164: 299-314.
53. Soltanian S, Stuyven E, Cox E, Sorgeloos P, Bossier P. 2009. Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical reviews in Microbiology.* 35:109-138
54. Sritunyaluksana K, Sithisarn P, Withayachumnarnkul B, Flegel TW. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunoestimulants. *Fish Shellfish Immunol.* 9:21-30
55. Sukumaran V, Lowman DW, Sajeevan TP, Philip R. 2010 Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture Res.*41:1799-1805.
56. Sun J, Wang L, Wang B, Guo Z, Liu M, Jiang K, Luo Z. 2007. Purification and characterisation of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 23: 292-299.
57. Sun J, Wang, L., Wang, B.J., Guo, Z.Y., Liu, M., Jiang, K.Y., Luo, Z.Y. 2007. Purification and characterization of a natural lectin from the serum of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 292–299.
58. 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.
59. Sun YD, Fu LD, Jia YP, Du XJ, Wang Q, Wang YH, Zhao XF, Yu XQ, Wang JX. 2008. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. *Mol Immunol.*45:343-361.

60. Vargas-Albores F, Hernández-López J, Gollas-Galván T, Montaña-Pérez K, Jiménez-Vega F, Yepiz-Plascencia G. 1998. Activation of shrimp cellular defence functions by microbial products. In Flgel TW(ed) Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.
61. Vazquez-Moreno L, Masso F, Rosas P, Montano LF, Zenteno E. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosemergii* (Crustacea, Decapoda) haemolymph. Comp. Bioch. Physiol. 105B: 617-623.
62. Vazquez-Moreno L, Perez A, Milland D. 1997 Morphological analysis of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. J Morphol. 234: 147-153.
63. Vazquez-Moreno L, Higuera-Ciapara I, Yepiz-Plascencia G. 1997. Purification of Hemocyanin from White shrimp (*Penaeus vannamei* Boone) by immobilized Metal Affinity Chromatography. Comp. Biochem. Physiol. 117B: 203-208.
64. Vazquez-Moreno L, Sierra C, Juárez S, Agundis C, Zavala A, Zenteno E. 1998. Mecanismos de Inmunidad en Crustáceos. Interciencia. 23: 344-348.
65. 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.
66. Xian-Wei W, Wen-Teng X, Xiao-Wen Z, Xiao-Fan Z, Xiao-Qiang Y, Jin-Xing W. 2009. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp. Fish Shellfish Immunol. 27:556-562
67. Xian-Wei W, Xiao-Wen Z, Wen-Teng X, Xiao-Fan Z, Jin-Xing W. 2009. A novel C-type lectin(FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp. Dev Comp Immunology. 33: 1039-1047.
68. Xian-Wei W, Jin-Xing W. 2012. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. Developmental and Comparative Immunology. Article in Press.
69. Yang C, Zhang J, Li F, Ma H, Zhang Q, Jose Priya TA, Zhang X, Xiang J. 2008. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. Fish Shellfish Immunol. 24: 564-574.



70. Zarian MH. 2007. Inmunoestiulación en camarones. Bolentin del PRONALSA. 1:10-11.
71. Zenteno R, Vazquez L, Martínez-Cairo S, Bouquelet S, Agundis C y Zenteno E. 2000. Identification of lectin isoforms in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosebergii* (DeMan, 1879). Glycoconj. J. 17: 339-347.
72. Zhang Q, Tan B, Mai K, Zhang W, Ma H, Ai Q, Wang X, Liufu Z. 2011. Dietary administration of Bacillus (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquaculture Res.42: 943-952.
73. Zhang X, Huang C, Qin Q. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. Antiviral Res. 61: 93-99
74. Zhang Y, Qiu L, Song L, Zhang H, Zhao J, Wang L, Yu Y, Li C, Li F, Xing K, Huang G. 2009. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 26: 183-192.
75. Zhi-Ying Z, Zhi-Xin Y, Xiao-Peng X, Shao-Ping W, Xia-Yu R, Zong-Xian D, Yon-Wen L, Yan G, Zong-Sheng L, Hao-Ji G, Se-Dong L, Siu-Ming C, Xiao-Qiang Y, Jian-Guo H. 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. J. Virol. 83:347-356.