

Eficiencia de lectinas como inmunoindicadores en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Malacostraca: Penaeidae)

Efficiency of lectins as immune indicators in juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Malacostraca: Penaeidae)

Miriam Victoria Martín-Manzo¹, Carlos Angulo¹, Edgar Zenteno-Galindo², Arturo Pedro Sierra-Beltrán¹, Concepción Agundis-Mata², Felipe Ascencio¹, María Antonia Guzmán-Murillo¹, Irasema Elizabeth Luis-Villaseñor³, Alí Pereyra² y Ángel Isidro Campa-Córdova¹

Recibido: 12 de septiembre de 2017.

Aceptado: 19 de octubre de 2018.

Publicado: 14 de diciembre de 2018.

RESUMEN

Antecedentes: Las lectinas actúan como unidades de reconocimiento para facilitar la eliminación de patógenos invasivos en plantas y animales, participan en mecanismos de defensa y actúan como mediadores de reconocimiento en la respuesta inmune de invertebrados. Existen pocos estudios dirigidos a evaluar el efecto de inmunostimulantes sobre la activación de lectinas en crustáceos. **Objetivos:** Evaluar la concentración de lectina en juveniles de camarón blanco tratados con inmunostimulantes de origen microbiano y comercial. **Métodos:** Se utilizaron cinco tratamientos agregados directamente al agua de cultivo cada tercer día durante 12 días: 1) laminarina (0.5 mg ml⁻¹); 2) mezcla 1 (*Bacillus tequilensis* y *B. licheniformis*; 2 x 10⁶ UFC ml⁻¹, proporción 1:1); 3) mezcla 2 (*B. endophyticus*, cepa YC3-B y cepa C2-2; 2 x 10⁶ UFC ml⁻¹, proporción 1:1); 4) *Debaryomyces hansenii* (1 x 10⁶ UFC ml⁻¹); 5) control (sin inmunostimulantes). Después de los 12 días de tratamiento se tomaron muestras de hemolinfa a las 24, 48 y 72 h para la cuantificación de lectina en plasma, para ello se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (MrL). **Resultados:** A las 24 h posteriores a la última aplicación del tratamiento, se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración de lectina en el plasma de *L. vannamei* de los camarones expuestos al inmunostimulante comercial laminarina respecto al grupo control, seguida por la mezcla 1 y la mezcla 2 a las 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. A las 48 h no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos y el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en los camarones expuestos a la cepa de *D. hansenii* respecto al grupo control. **Conclusiones:** Se observó que la concentración de lectina en el plasma de camarón blanco puede incrementarse por el uso de inmunostimulantes y utilizarse como herramienta bioindicadora de inmunostimulación.

Palabras clave: anticuerpos monoclonales, inmunostimulantes, lectinas, *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

Background: Lectins act in plants and animals as recognition units against invasive pathogens, participate by activating the immune system, and function as recognition mediators of immune response in invertebrates. Few studies have evaluated the effect of immunostimulants on the activation of lectins in crustaceans. **Goals:** To evaluate the lectin concentration in juvenile shrimp treated with commercial and microbial immunostimulants. **Methods:** Five treatments were added directly to the culture tanks every third day during 12 days: 1) laminarin (0.5 mg ml⁻¹); 2) mix 1 (*Bacillus tequilensis* and *B. licheniformis*; 2x10⁶ CFU ml⁻¹, 1:1 proportion); 3) mix 2 (*B. endophyticus*, strain YC3-B and strain C2-2; 2x10⁶ CFU ml⁻¹, proportion 1:1); 4) *Debaryomyces hansenii* (1x10⁶ CFU ml⁻¹); 5) control (without immunostimulants). At day 12, after the last treatments were added, samples of hemolymph were extracted from shrimp at 24, 48, and 72 h to determine lectin concentration by the ELISA method, using monoclonal antibodies against *Macrobrachium rosenbergii* lectin (MrL). **Results:** Significant differences ($p < 0.05$) in the lectin concentration were found in shrimp groups treated with laminarin at 24 h after the last exposure to the treatment, followed by mix 1 and mix 2 at 72 h after exposure to the treatments. At 48 h, treatments did not register significant differences ($p > 0.05$) when compared to the control groups. Shrimp exposed to *D. hansenii* did not show significant increase in lectin concentration compared to the control groups. **Conclusions:** This study showed that lectin concentration may be increased in plasma of juvenile shrimp and used as a bioindicator tool of immunostimulation.

Keywords: immunostimulants, lectins, *Litopenaeus vannamei*, monoclonal antibodies

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Instituto Politécnico Nacional 195, col. Playa Palo de Santa Rita. La Paz, Baja California Sur, 23096. México

² Facultad de Medicina, UNAM, Departamento de Bioquímica. Edificio D, primer piso, Ciudad Universitaria. Ciudad de México, 04510. México

³ Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Paseo Claussen s/n, col. Los Pinos. Mazatlán, Sinaloa, 82000. México

*Author for correspondence:
angcamp04@cibnor.mx

To cite as:

Martín-Manzo M. V., C. Angulo, E. Zenteno-Galindo, A. P. Sierra-Beltrán, C. Agundis-Mata, F. Ascencio, M. A. Guzmán-Murillo, I. E. Luis-Villaseñor, A. Pereyra y Á. I. Campa-Córdova. 2018. Eficiencia de lectinas como inmunoindicadores en juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Malacostraca: Penaeidae). *Hidrobiológica* 28 (3): 287-294.

DOI:

INTRODUCCIÓN

Los camarones carecen de una respuesta inmune específica o adaptativa, por lo que dependen de su sistema innato para combatir a los patógenos que los afectan. Este sistema incluye la protección por barreras físicas y la defensa interna mediada por efectores celulares (hemocitos) y humores (plasma) (Tassanakajon *et al.*, 2013). Dentro del sistema humoral se encuentran las lectinas, que actúan como unidades de reconocimiento para facilitar la eliminación de patógenos invasivos y desencadenar diferentes mecanismos de defensa (Wang & Wang, 2013; Lu *et al.*, 2017); entre ellos, aglutinación, fagocitosis mediada por opsonización y encapsulación de virus, bacterias y hongos y activación del estallido respiratorio. Además, las lectinas participan en la activación del sistema profenoloxidasas y algunas pueden presentar actividad antimicrobiana (Wei *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014ab; Wang *et al.*, 2014).

Los inmunoestimulantes se encuentran disponibles como tratamientos alternativos, que actúan como moléculas de alarma para activar el sistema inmune del camarón (Pais *et al.*, 2008). La mayoría son compuestos químicos que se encuentran como elementos estructurales de bacterias, micelios de hongos y levadura (Alpuche *et al.*, 2005). Los inmunoestimulantes más utilizados para evaluar los efectos que provocan sobre el sistema inmune de camarones forman parte del grupo de los lipopolisacáridos (LPS), β -1,3/1,6 glucanos y peptidoglucanos (Amparyup *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

Los glucanos han sido ampliamente utilizados como inmunoestimulantes para aumentar la resistencia de los crustáceos contra las enfermedades virales (Wilson *et al.*, 2015). Se han realizado varios estudios sobre el efecto de los β -1,3 glucanos en algunos factores de la respuesta inmune innata de los camarones (Campa-Córdova *et al.*, 2005; Sukumaran *et al.*, 2010; Sarlin & Philip, 2011; Zhao *et al.*, 2012). De forma similar, los peptidoglucanos han tenido éxito al ser utilizados como inmunoestimulantes en los camarones (Itami *et al.*, 2002; Purivirojkul *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2015). Además, en varias investigaciones se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* pueden estimular la respuesta del sistema inmune o la resistencia al virus de la mancha blanca (Li *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011; Chai *et al.*, 2016). Sin embargo, son pocos los estudios enfocados en evaluar el efecto de los glucanos y de los peptidoglucanos de bacterias y levaduras en la inmunoestimulación de lectinas en camarones (Sritunyalucksana *et al.*, 1999; Pais *et al.*, 2008; Bae *et al.*, 2012). Considerando que los anticuerpos monoclonales antilectina de *Macrobrachium rosenbergii* (MrL) (De Man, 1879) presentaron reacción cruzada con lectinas de diferentes crustáceos (Pereyra *et al.*, 2009), en este estudio se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la lectina de MrL para evaluar el efecto de diferentes inmunoestimulantes sobre la concentración de lectina en la hemolinfa de *L. vannamei* (Boone, 1931).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron juveniles de camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, obtenidos de los estanques de cultivo 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 l con agua de mar filtrada (5 μ m) a una temperatura de 28 °C y aireación constante. Los camarones fueron alimentados diariamente *ad libitum*

en la mañana y en la tarde (8:00 am y 5:00 pm) por medio del alimento comercial marca Piasa (La Paz, B.C.S., México) con 35 % de proteína.

Obtención de hemolinfa de camarón para la purificación de lectinas. Previo al bioensayo con inmunoestimulantes, se extrajo hemolinfa a un lote de 30 camarones juveniles de 8.0 ± 0.5 g de peso promedio. A cada camarón se le extrajo un aproximado de 1 ml de hemolinfa sin anticoagulante en 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 plasma, el cual se mantuvo en congelación a -4 °C hasta su utilización (Alpuche *et al.*, 2005).

Aislamiento y purificación de lectinas. Las lectinas de *L. vannamei* se purificaron por cromatografía de afinidad con una matriz de eritrocitos de rata lisados y contenidos en una columna de Sephadex G-25 (15 x 2 cm) mediante el método de Alpuche *et al.* (2005) modificado. La columna fue equilibrada con solución salina al 0.9%, a la cual se le aplicaron 300 μ l de plasma de *L. vannamei* (previamente incubados 20 min a 37 °C con 300 μ l de CaCl_2 40 mM) a un flujo de 2 ml min⁻¹. Mientras que el material no retenido fue eluido con solución salina al 0.9% hasta que la densidad óptica a 280 nm de las fracciones colectadas (2 ml) fue menor a 0.001. La lectina fue eluida posteriormente de la columna por medio de ácido acético al 3%.

Caracterización de lectina de *L. vannamei*. La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976). Las muestras se leyeron a una absorbancia de 570 nm y se calculó la concentración de proteínas en mg ml⁻¹ de suero de camarón.

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 μ l o 25 μ l, según la turbidez de la muestra) fue precipitada con acetona y ácido tricloroacético (TCA) al 20% y fue suspendida en 20 μ l 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), en el cual se utilizan geles de poliacrilamida al 10% y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Se usaron 2 μ l de agregado de lectina (fracción retenida), 20 μ g de suero y 20 μ g de la fracción no retenida, los cuales fueron precipitados con TCA al 20 % y acetona, y suspendidos en 15 μ l de amortiguador (Sigma). Posteriormente, fueron sometidos a ebullición por 10 minutos. Se utilizaron estándares de peso molecular conocido con un rango de 6.5 a 205 kDa (Amersham Biosciences, Reino Unido). La migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 80 V en amortiguador de corrida (TRIS 0.025 M, glicina 0.190 M, SDS 0.2%). El gel se tiñó con plata mediante el kit Bio-Rad Silver Stain (<http://www.bio-rad.com/es-mx/product/silver-stains-kits>). La migración relativa (Rf) de los estándares y la muestra se calcularon con la fórmula: Rf = distancia de migración de la proteína/distancia de migración del colorante, y para calcular el peso molecular de la lectina purificada se construyó una curva estándar.

Actividad hemaglutinante de la lectina. Se obtuvieron eritrocitos de ratón, rata, conejo, hámster y cuyo del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, así como eritrocitos humanos tipo A, B y O del banco de sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social (México). Se evaluó la actividad hemaglutinante de lectinas de camarón con base

en el método descrito por Alpuche *et al.* (2005) para *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767). 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, Estados Unidos)] por 0.5 ml de paquete de eritrocitos incubados a 37 °C por 30 min, usando como control positivo lectina *Arachis hypogaea* (Linnaeus, 1753) (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 y se incubaron 30 min a 37 °C con 25 µL de azúcares a 400 mM. Inmediatamente después, se añadieron 25 µL 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 de 512 UHA.

Preparación de inmunoestimulantes. La cepa probiótica de levadura *Debaryomyces hansenii* [Zopf] Lodder and Kreger-van Rij, cepa DHHBCS005], que se obtuvo de la Colección de Levaduras Marinas del Cibnor, fue cultivada en 500 ml del medio YPD-caldo (Difco), a 30 °C durante 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 1×10^9 UFC ml⁻¹. A partir de la concentración que se obtuvo, se realizaron las diluciones requeridas en los bioensayos para utilizar una concentración final de 1×10^6 UFC ml⁻¹.

Bacterias del género *Bacillus* (*B. tequilensis* Gatson *et al.*, 2006; *B. licheniformis* Weigmann, 1898; *B. endophyticus* Reva *et al.*, 2002), que fueron aisladas del intestino de *L. vannamei* (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011) y donadas por el Laboratorio de Patología del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, fueron cultivadas en 500 ml de caldo marino, a 30 °C durante 24 h. Las bacterias fueron suspendidas en agua de mar estéril con 0.9 % de NaCl y se determinó la concentración por medio del colorímetro Linson 3, a una longitud de onda de 540 nm hasta llegar a una absorbancia de 0.7 para obtener una concentración de 1×10^9 UFC ml⁻¹. A partir de la concentración obtenida, se realizaron las diluciones requeridas en los bioensayos para utilizar una concentración final de 1×10^6 UFC ml⁻¹ de cada una de las cepas bacterias. Se hicieron dos mezclas de bacterias: mezcla 1, YC5-2: *Bacillus tequilensis* (1×10^6 UFC ml⁻¹) y YC3-C *Bacillus licheniformis* (1×10^6 UFC ml⁻¹); mezcla 2, YC3-B: *Bacillus endophyticus* (1×10^6 UFC ml⁻¹) y C2-2: *Bacillus endophyticus* (1×10^6 UFC ml⁻¹).

Se utilizó la laminarina (β-1,3 glucano), que se extrajo de la macroalga *Laminaria digitata* (Hudson) J.V.Lamoureaux, como inmunoestimulante comercial (Sigma # Cat. L-9634). Las suspensiones de β-1,3 glucano se mezclaron en 10 L de agua de mar para obtener una concentración final de 0.5 mg ml⁻¹.

Cultivo de juveniles de *L. vannamei* tratados con inmunoestimulantes comerciales y *Debaryomyces hansenii*. Se colocaron 5 grupos con 15 camarones cada uno, con peso promedio de 5 ± 0.1 g en tanques de fibra de vidrio con capacidad de 30 L con agua de mar filtrada a 1 µm con aireación constante y una temperatura de 28 °C ± 0.5. Los 5 tratamientos se agregaron directamente al agua de cultivo cada 48 h durante 12 días de cultivo: 1) Control, sin tratamientos; 2) Laminarina (β-1,3 glucano, 0.5 mg ml⁻¹); 3) mezcla 1 (*B. tequilensis*, 1×10^6 UFC ml⁻¹; *B. licheniformis*, 1×10^6 UFC ml⁻¹); 4) mezcla 2 (*B. endophyticus*, 1×10^6 UFC ml⁻¹; *B. endophyticus*, 1×10^6 UFC ml⁻¹); 5) levadura (*D. hansenii*, 1×10^6 UFC ml⁻¹). Los camarones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial (Piasa, 35 % de proteína) dos veces con recambio de agua diario del 60%. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se tomaron al azar 3 camarones de cada grupo, a las 24, 48 y 72 h después de la última aplicación de los tratamientos (día 12), para la cuantificación de lectinas.

Obtención de hemolinfa de camarones tratados. A cada camarón se le extrajo 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). El anticoagulante fue diseñado con base en los valores iónicos y osmóticos de la hemolinfa del camarón (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA-Na₃, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm kg⁻¹) de acuerdo con la técnica descrita por Vargas-Albores *et al.* (1993). Las muestras se centrifugaron a 800 g-rfc por 10 min a 4 °C para obtener el plasma, el cual se mantuvo en congelación a -20 °C hasta su posterior utilización.

Determinación de la concentración de lectina. La concentración de lectina en la hemolinfa del camarón blanco se determinó por ELISA en placas de poliestireno, al utilizar anticuerpos monoclonales contra la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (MrL) de acuerdo al método descrito por Agundis *et al.* (2000), con algunas modificaciones. En breve, el plasma de *L. vannamei* fue diluido 1/10 en 0.1 M de amortiguador de carbonato (pH 9.5) y se fijó al fondo de los pozos con una incubación de 100 µl de amortiguador de carbonato (pH 9.5) a 37 °C durante una hora y posteriormente a 4 °C toda la noche; después, las placas se lavaron cuatro veces con PBS adicionado de 0.01% Tween 20 (PBS-T). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con 300 µl de PBS con 5% de leche descremada e incubados 60 min a 37 °C, para luego ser lavados 4 veces con PBS-T. Después se agregaron 100 µl 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 µl de O-fenilendiamina y H₂O₂ en 100 mM de amortiguador de citratos (pH 5.6). La reacción se detuvo al agregar 100 µl de 3N HCl y las muestras se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA. La estandarización de la curva se realizó mediante lectina MrL y anticuerpos contra la lectina MrL de acuerdo con el método descrito por Agundis *et al.* (2000).

Para confirmar que los anticuerpos monoclonales de MrL reconocen a la lectina de *L. vannamei* se realizó un Western blot. La lectina de *L. vannamei* fue separada electroforéticamente en un gel de poliácridamida con urea al 10%, de acuerdo con el método descrito por Bollag *et al.* (1996); después fue transferida a una membrana de nitrocelulosa, como indica el método descrito por Towbin *et al.* (1979), por medio de un aparato de transferencia semi-seca (Bio-Rad) a 25 mV por 1.5 h. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con PBS-leche toda la

noche a 4 °C y posteriormente se lavaron con PBS-T varias veces. La membrana se incubó con anticuerpos contra la lectina de MrL en una dilución de 1:100 por 2 h y se lavó con PBS-T. La reacción fue revelada al agregar una solución de 3-3 diaminobenzidina y H_2O_2 en PBS.

Análisis estadísticos. Se realizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov para verificar la normalidad de la distribución de los datos, y la prueba de homoscedasticidad de Bartlett para corroborar la homogeneidad de distribución de varianzas. Se efectuó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar si hubo diferencias significativas en la concentración de lectinas en el plasma entre los camarones expuestos a diferentes inmunoestimulantes y el control. Cuando se encontraron diferencias, se realizó un análisis posterior de Tukey. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa Statistics v9.

RESULTADOS

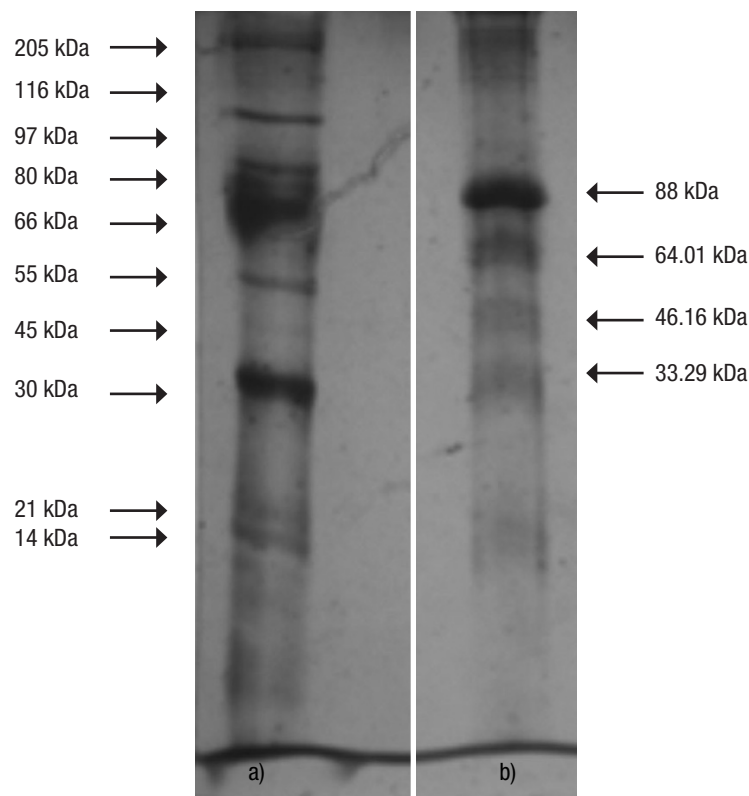
Purificación de lectina. A partir de hemolinfa de *L. vannamei* se purificó una lectina mediante cromatografía de afinidad en una columna de estroma de eritrocitos de rata. La fracción no retenida no mostró aglutinación de eritrocitos de conejo ni de rata en solución salina-calcio al 2 %. En contraparte, la fracción retenida presentó actividad hemaglutinante en eritrocitos de conejo y rata, 640 y 320 UHA (unidades hemaglutinantes por ml de muestra), respectivamente.

Se determinó el peso molecular de la lectina por electroforesis en gel de poliacrilamida con urea y ténido con plata, y se obtuvieron 4 fracciones proteicas de 80 kDa, 61 kDa, 48 kDa, y 33 kDa (Fig. 1). El suero de camarón aglutinó eritrocitos de diferentes especies, en especial eritrocitos de ratón, que fueron 8 veces más que los eritrocitos de las otras especies probadas (conejo, rata, cuyo, hámster y humano). La actividad aglutinante aumentó en presencia de $CaCl_2$, de eritrocitos tratados con tripsina y algunos tratados con sialidasa (conejo, hámster y humano).

La especificidad se determinó al comparar la actividad inhibitoria de 9 carbohidratos (200 mM) en la hemaglutinación de eritrocitos de conejo al 2 %. La D-glucosamina fue el mayor inhibidor de aglutinación con un 96.8%, seguido de fucosa con 87.5%, galactosa y glucosa con 75%. Los 5 monosacáridos restantes, N-acetil-glucosamina, galactosamina, N-acetil-galactosamina, manosa y manosamina, no inhibieron la aglutinación.

Se realizó un Western blot utilizando agregados de la lectina purificada de camarón blanco y anticuerpos monoclonales contra la lectina de *M. rosenbergii* a una dilución de 1:40, lo cual reveló que los anticuerpos monoclonales contra la lectina de MrL reconocen 3 (80, 61 y 48 kDa) de las 4 fracciones purificadas de la lectina de *L. vannamei* (Fig. 2).

Concentración de la lectina en plasma de camarón expuesto a inmunoestimulantes. En la Figura 3 se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) en los camarones tratados con laminarina respecto



Figuras 1a-b. Electroforesis en gel de poliacrilamida con urea de lectina purificada en la columna de estroma de rata. Carril (a): marcadores moleculares. Carril (b): lectina purificada de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931).

al grupo control, a las 24 h posteriores a la última administración de los tratamientos. A las 48 h posteriores a la exposición de los inmunostimulantes no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto al control. Los juveniles expuestos a la mezcla 1 (*B. tequilensis* + *B. licheniformis*) y mezcla 2 (*B. endophyticus* + *B. endophyticus*) registraron un aumento significativo en la concentración de lectina a las 72 h respecto al grupo control. La concentración de lectina no se modificó significativamente en los juveniles tratados con la levadura *D. hansenii* respecto al grupo control (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Los invertebrados 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 (Wang & Wang, 2013; Li & Xiang, 2013). Asimismo, 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 (Wei *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014ab; Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

En este trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales contra la lectina de *M. rosenbergii* (MrL) para determinar la concentración de lectina en plasma de *L. vannamei*. Los anticuerpos monoclonales tienen una alta especificidad; sin embargo, algunos anticuerpos monoclonales de gran afinidad presentan reactividad cruzada. En una investigación realizada 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* (Girard, 1852); *Procambarus americanus* (H. Milne-Edwards, 1837); *Litopenaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) y *Pseudosquilla americana* (Saussure, 1857). Sus resultados sugieren que los anticuerpos reconocen regiones conservadas en las moléculas de lectina de estas especies. En la inmunoelectrotransferencia se identificó que los anticuerpos pueden reconocer 3 (80, 61, 48 kDa) de las 4 fracciones de lectina purificada de *L. vannamei*, lo cual implica un reconocimiento del 75% de lectina presente en la hemolinfa. Es probable que la lectina de *M. rosenbergii* y *L. vannamei* compartan epítopos comunes, debido a que las lectinas de estos crustáceos se consideran evolutivamente bien conservadas (Pereyra *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011; Denis *et al.*, 2016). Adicionalmente, en un estudio realizado por Pereyra *et al.* (2012), anticuerpos monoclonales anti MrL de *M. rosenbergii* detectaron dos subunidades de lectina (42.7 y 66.2 kDa) de *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868), de las 3 subunidades previamente purificadas (86.6, 42.7 y 66.2 kDa), lo cual demuestra que el anticuerpo reconoce epítopos conservados en lectinas de ambas especies.

La administración de glucanos en la dieta pueden estimular el sistema profenoloxidasas y la aglutinación de patógenos mediada por lectinas (Sivakamavalli & Vaseeharan, 2014; Sivakamavalli *et al.*, 2015), las cuales se incrementan después de un reto infeccioso en el camarón (Bae *et al.*, 2012). Pais *et al.* (2008) trataron durante 1 h vía inmersión a juveniles de *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) con β -glucanos extraídos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen Ex E.C. Hansen) a una concentración de 0.15 mg ml⁻¹, y observaron un aumento a las

24 h de postinmersión en los niveles de hemaglutinación de eritrocitos de ratón al ser expuestos al suero del camarón. De forma similar, en este estudio los camarones expuestos vía inmersión al β -glucano del inmunostimulante comercial (laminarina, 0.5 mg ml⁻¹) incrementaron la concentración de lectina en hemolinfa a las 24 h posteriores al tratamiento.

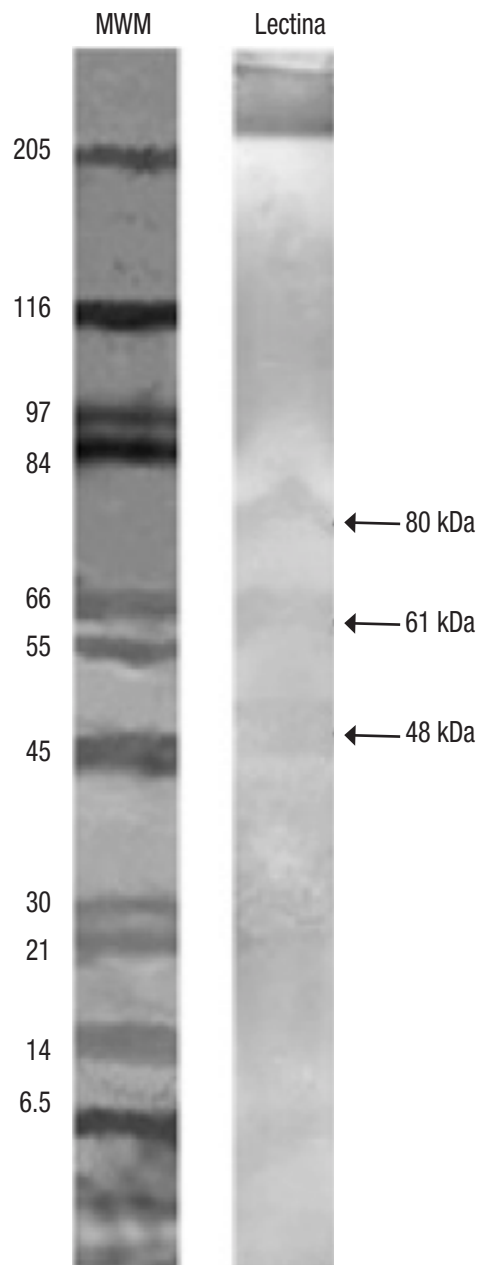


Figura 2. Western blot de lectina de camarón *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y anticuerpos monoclonales contra MrL.

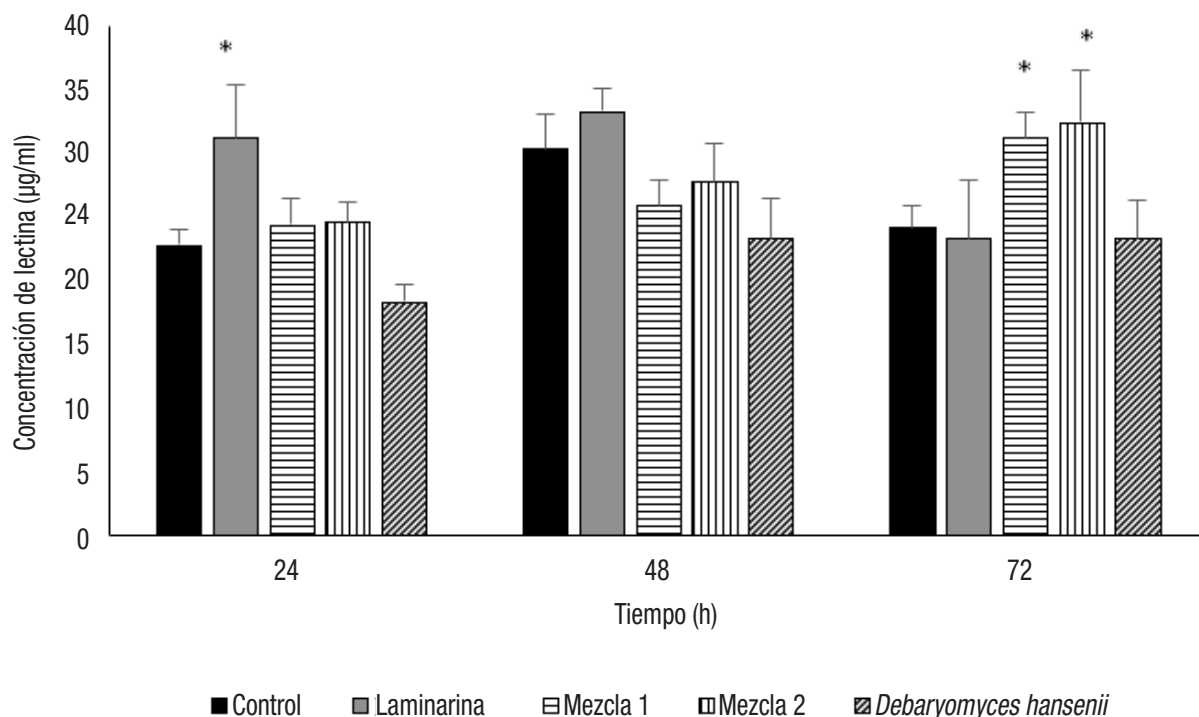


Figura 3. Concentración de lectinas en plasma de juveniles de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) durante las 72 h posteriores a la última aplicación de los tratamientos (día 12). Barras verticales indican desviación estándar. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

En estudios previos se ha reportado la importancia en la frecuencia de administración de los inmunoestimulantes, ya sea vía inmersión o incluidos en el alimento, para que el camarón mantenga un mejor estado inmunológico durante su cultivo (Pacheco-Marges *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016). En este estudio, la frecuencia de administración de los inmunoestimulantes se realizó cada tercer día, y se encontró que en los camarones tratados vía inmersión con laminarina se indujo un incremento en la concentración de lectinas a las 24 h posteriores a la última aplicación de los tratamientos, seguida a las 72 h por las mezclas 1 (*B. tequilensis* y *B. licheniformis*) y 2 (cepas YC3-B y C2-2 de *B. endophyticus*). Sung *et al.* (1994) demostraron que la supervivencia de *Penaeus monodon* puede incrementarse si los camarones se inmunoestimulan hasta 18 días antes de un reto con *Vibrio vulnificus*. Campa-Córdova *et al.* (2002) reportaron que no es necesario aplicar inmunoestimulantes diariamente a juveniles de *L. vannamei*, ya que una sola aplicación incrementa la respuesta inmune de los camarones durante 7 días. Campa-Córdova *et al.* (2005) utilizaron concentraciones subletales de *Vibrio penaeicida* para activar la respuesta inmune en juveniles de *L. vannamei*, y encontraron que los camarones previamente expuestos a α -glucano, lipopolisacárido y fucodán mantuvieron una respuesta inmune superior al control hasta 10 días posteriores a la aplicación de los inmunoestimulantes.

Al tratar a los camarones con *D. hansenii* (1×10^6 UFC ml⁻¹) no se detectó un incremento en la concentración de lectina respecto al grupo control, lo que sugiere como posible causa una dosis insuficiente de levadura. En este sentido, Chai *et al.* (2016) observaron que la supe-

mentación de *Bacillus* sp. a concentraciones más altas de 1×10^7 y 1×10^9 UFC ml⁻¹ aumentó la expresión del gen de la lectina tipo C en hemocitos de camarón blanco *L. vannamei*.

En este estudio se encontró que la concentración de lectina en plasma de *L. vannamei* se incrementa al exponer a los camarones a inmunoestimulantes de origen microbiano o comercial, por lo que podría ser utilizada como herramienta bioindicadora de inmunoestimulación en camarón. Se recomienda realizar más estudios con patógenos de camarón para determinar si el incremento de lectinas activado por exposición a inmunoestimulantes es suficiente para inducir resistencia a enfermedades de origen bacteriano o viral en los cultivos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el proyecto SEP-CONACYT (243532), Fronteras de la Ciencia (FC-2016/2820). Agradecemos a Roberto Hernández Herrera y a Pablo Monsalvo Spencer por el apoyo brindado al presente trabajo.

REFERENCIAS

- AGUNDIS, C., A. PEREYRA, R. ZENTENO, C. BRASSART, C. SIERRA, L. VAZQUEZ & E. ZENTENO. 2000. Cuantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA. 2000. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 127: 165-172. DOI:10.1016/S0305-0491(00)00248-0

- ALPUCHE, J., C. AGUNDIS, C. SOLÓRZANO & A. PEREYRA. 2005. Lectina en *L. Setiferus*: una alternativa en cultivo ante enfermedades que afectan al cultivo de camarones. *REDVET* 12: 1-12.
- ALPUCHE, J., A. PEREYRA, C. AGUNDIS, C. ROSAS, C. PASCUAL, M. C. SLOMIANNY, L. VÁZQUEZ & E. ZENTENO. 2005. Purification and characterization of a lectin from the White shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea: decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta* 1724: 86-93. DOI:10.1016/j.bbagen.2005.04.014
- AMPARYUP, P., J. SUTTHANGKUL, W. CHAROENSAPSRI & A. TASSANAKAJON. 2016. Pattern recognition protein binds to lipopolysaccharide and β -1,3-glucan and activates shrimp prophenoloxidase system. *The Journal of Biological Chemistry* 291 (20): 10949. DOI:10.1074/jbc.M111.294744
- BAE, S. H., B. R. KIM, B. J. KANG, N. TSUTSUI, T. OKUTSU, J. SHINJI, I. K. JANG, C. H. HAN & M. N. WILDER. 2012. Molecular cloning of prophenoloxidase and the effects of dietary β -glucan and rutin on immune response in hemocytes of the fleshy shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology* 33: 597-604. DOI:10.1016/j.fsi.2012.06.034
- BOLLAG, D. M., M. D. ROZYCKI & S. J. EDELSTEIN. 1996. Protein methods. Wiley-Liss. 432 p.
- BRADFORD, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- CAMPA-CÓRDOVA, A. I., N. Y. HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, R. DE PHILIPPIS & F. ASCENCIO. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 12: 353-366. DOI:10.1006/fsim.2001.0377
- CAMPA-CÓRDOVA, A. I., N. Y. HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, G. AGUIRRE-GUZMÁN & F. ASCENCIO. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) expuestos a inmunostimulantes. *Ciencias Marinas* 31: 661-669.
- CHAI, P. C., X. L. SONG, G. F. CHEN, H. XU & J. HUANG. 2016. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus* PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology* 54: 602-611. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.05.011
- CHEN, Y. Y., J. C. CHEN, Y. H. KUO, Y. C. LIN, Y. H. CHANG, H. Y. GONG & C. L. HUANG. 2016. Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) bind to seaweed polysaccharides and activate the prophenoloxidase system in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 55: 144-151. DOI:10.1016/j.dci.2015.10.023
- DENIS, M., K. THAYAPPAN, S. M. RAMASAMY & A. MUNUSAMY. 2016. Lectin in innate immunity of crustacea. *Austin Biology* 1 (1): 1-7.
- ITAMI, T. 2002. Promising strategies against WSSV for kuruma shrimp in Japan. *Asian Aquaculture* 24: 9-10.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LI, H., Y. CHEN, M. LI, S. WANG, H. ZUO, X. XU, S. WENG, J. HE & C. LI. 2015. A C-type lectin (LvCTL4) from *Litopenaeus vannamei* is a downstream molecule of the NF- κ B signaling pathway and participates in antibacterial immune response. *Fish & Shellfish Immunology* 43: 257-263. DOI:10.1016/j.fsi.2014.12.024
- LI, F. & J. XIANG. 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 34: 973-980. DOI:10.1026/fsi.2012.08.023
- LI, J., B. TAN, K. MAI. 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.
- LI, M., C. LI, C. MA, H. LI, H. ZUO, S. WENG, X. CHEN, D. ZENG, J. HE & X. XU. 2014. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental & Comparative Immunology* 46: 231-240. DOI:10.1016/j.dci.2014.04.014
- LU, J., Z. YU, C. MU, R. LI, W. SONG & C. WANG. 2017. Characterization and functional analysis of a novel C-type lectin from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 64: 185-192. DOI:10.1016/j.fsi.2017.03.013
- LUIS-VILLASEÑOR, I., M. E. MACÍAS-RODRÍGUEZ, B. GÓMEZ-GIL, F. ASCENCIO-VALLE & A. I. CAMPA-CÓRDOVA. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321: 136-144. DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.08.036
- LUIS-VILLASEÑOR, I., T. CASTELLANOS-CERVANTES, B. GÓMEZ-GIL, A. E. CARRILLO-GARCÍA, A. I. CAMPA-CÓRDOVA & F. ASCENCIO. 2013. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 257-265. DOI:10.1007/s11274-012-1177-0
- LUO, Z., J. ZHANG, F. LI, X. ZHANG, C. LIU & J. XIANG. 2011. Identification of a novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* and its role in defense against pathogens infection. *Chinese Journal of Oceanography and Limnology* 29 (5): 942-951. DOI: 10.1007/s00343-011-0249-6
- PACHECO-MARGES, M. R., A. I. CAMPA-CÓRDOVA, G. AGUIRRE-GUZMÁN, A. LUNA-GONZÁLEZ, M. A. GUZMÁN-MURILLO & F. ASCENCIO. 2012. Efecto de *Debaromyces hansenii* en la respuesta antioxidante de juveniles de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. *Revista MVZ Córdoba* 17 (1): 2820-2826.
- PAN, M. V., R. F. M. TRAFALGAR, A. E. JR. SERRANO & V. L. JR. CORRE. 2015. Immunomodulatory and growth promoting effects of peptidoglycan supplementation in Black tiger shrimp *Penaeus monodon* Fabricius 1798. *Asian Fisheries Science* 28: 60-71.
- PAIS, R., R. KHUSHIRAMANI, I. KARUNASAGAR & I. KARUNASAGAR. 2008. Effect of immunostimulants on the haemolymph haemagglutinins of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research* 39: 1339-1345. DOI:10.1111/j.1365-2109.2008.02004.x
- PEREYRA, A., C. AGUNDIS, B. BARRERA, J. ALPUCHE, C. SIERRA, R. ZENTENO, E. ZENTENO & L. VÁZQUEZ. 2009. The use of monoclonal antibodies anti-lectin form freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879) in the recognition of protein with lectin activity in decapod's hemolymph. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 39: 308-322. DOI: 10.1080/10826060902953384

- PEREYRA, A., J. ALPUCHE, J. C. SAINZ, E. ZENTENO & C. AGUNDIS. 2012. Purification and partial characterization of a lectin from the prawn *Macrobrachium americanum* (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 85: 1253-1267.
- PURIVIROJKUL, W., N. AREECHON & P. SRISAPPOOME. 2006. The effect of peptidoglycan on immune response in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Kasetsart Journal: Natural Science* 40: 11-187.
- SARLIN, P. J. & R. PHILIP. 2011. Efficacy of marine yeasts and baker's yeast as immunostimulants in *Fenneropenaeus indicus*: A comparative study. *Aquaculture* 321: 173-178. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.08.039
- SIVAKAMAVALLI, J. & B. VASEEHARAN. 2014. Purification, characterization and functional role of lectin from green tiger shrimp *Penaeus semisulcatus*. *International Journal of Biological Macromolecules* 67: 64-70. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.03.008
- SIVAKAMAVALLI, J., S. K. TRIPATHI, S. K. SINGH & B. VASEEHARAN. 2015. Homology modeling, molecular dynamics, and docking studies of pattern-recognition transmembrane protein-lipopolysaccharide and β -1,3 glucan-binding protein from *Fenneropenaeus indicus*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 33: 1269-1280. DOI:10.1080/07391102.2014.943807
- SMITH, V. J. & K. SÖDERHÄLL. 1983. β -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biological Bulletin* 164: 299-314. DOI:10.2307/1541146
- SRITUNYALUCKSANA, K., P. SITHISARN, B. WITHAYACHUMNARNKUL & T. W. FLEGEL. 1999. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunoestimulants. *Fish & Shellfish Immunology* 9: 21-30. DOI:10.1006/fsim.1998.0161
- SUKUMARAN, V., D. W. LOWMAN, T. P. SAJEEVAN & R. PHILIP. 2010. Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquaculture Research* 41: 1799-1805. DOI:10.1111/j.1365-2109.2010.02520.x
- SUNG, H. H., G. H. KOU & L. SONG. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology* 29: 11-17. DOI:10.3147/jsfp.29.11
- TASSANAKAJON, A., SOMBOONWITAT, K., SUPUNGUL, P. & S. TANG. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 34: 954-967. DOI:10.1016/j.fsi.2012.09.021
- TOWBIN, H., T. STAHELIN & J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 4350-4354.
- VARGAS-ALBORES, F., M. A. GUZMAN, J. L. OCHOA. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). 1993. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106A: 299-303.
- WANG, X. W. & J. X. WANG. 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 39: 27-38. DOI:10.1016/j.dci.2012.04.009
- WANG, X. W., J. D. XU, X. F. ZHAO, G. R. VASTA & J. X. WANG. 2014. A shrimp C-type lectin inhibits proliferation of the hemolymph microbiota by maintaining the expression of antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry* 289: 11779-11790. DOI:10.1074/jbc.M114.552307
- WEI, X., X. LIU, J. YANG, J. FANG, H. QIAO, Y. ZHANG & J. YANG. 2012. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 132-140. DOI:10.1016/j.fsi.2011.11.001
- WILSON, W., D. LOWMAN, S. P. ANTONY, J. PUTHUMANA, I. S. BRIGHT SINGH & R. PHILIP. 2015. Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 43: 346-56. DOI:10.1016/j.fsi.2014.12.032
- XU, Y. H., W. J. BI, X. W. WANG, Y. R. ZHAO, X. F. ZHAO & J. X. WANG. 2014a. Two novel C-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class A domain have antiviral function in the shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Developmental & Comparative Immunology* 42: 323-332.
- XU, S., L. WANG, X. W. WANG, Y. R. ZHAO, W. J. BI, X. F. ZHAO & J. X. WANG. 2014b. L-Type lectin from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* promotes hemocyte phagocytosis. *Developmental & Comparative Immunology* 44: 397-405. DOI:10.1016/j.dci.2014.01.016
- ZHANG, Q., B. TAN, K. MAI, W. ZHANG, H. MA, Q. AI, X. WANG & Z. LIUFU. 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 Research* 42: 943-952. DOI:10.1111/j.1365-2109.2010.02677.x
- ZHAO, H. X., J. M. CAO, A. L. WANG, Z. Y. DU, C. X. YE, Y. H. HUANG, H. B. LAN, T. T. ZHOU & L. G. L. LI. 2012. Effect of long-term administration of dietary B 1,3 glucan on growth, physiological, and immune responses in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture International* 20: 145-158. DOI:10.1007/s10499-011-9448-6