

SECRETARIA
DE
EDUCACION PUBLICA

CIENCIAS MARINAS
BIBLIOTECA
I.P.N.
DONATIVO



CICIMAR

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

CIENCIAS MARINAS

"ACTIVACION DEL SISTEMA FENOLOXIDASA DE HEMOCITOS DE
CAMARON CAFE (*Penaeus californiensis*) Y SU EFECTO EN LA
FAGOCITOSIS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Jorge Hernández López

Indice

Resumen	1
Abstract	III
Introducción	I
Antecedentes	4
Justificación	7
Objetivos	8
Metodología	9
Resultados	13
Discusión	27
Conclusiones	34
Anexo	36
Bibliografía	38

Glosario

proFO (proPO)*	=	Profenoloxidasa
FO (PO)*	=	Fenoloxidasa
EApFO (AEpPO)*	=	Enzima activadora de la profenoloxidasa
SLH (HLS)*	=	Sobrenadante de Lisado de hemocitos
LPS	=	Lipopolisacárido
BGBP	=	proteína que une beta glucanos (Beta giucan binding protein).
GRR	=	Globulos rojos de ratón
L-DOPA	=	L-3,4 Dihidroxifenilalanina
SIC (SSS)*	=	Solución isotónica para camarón
SDS	=	Dodecii sulfato de sodio
NaCl	=	Cloruro de sodio
STI	=	Inhibidor de tripsina (Soybean trypsin inhibitor)
EDTA	=	Acido etilen diamino tetracético
CIBNOR	=	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
g	=	Unidades de fuerza centrífuga: $g = 1.12r \left(\frac{RPM}{1000} \right)^2$ Donde: r = Radio del rotor en mm RPM= Revoluciones por minuto.

*: Los paréntesis indican las abreviaciones en inglés

Resumen

El sistema **proFO** ha sido encontrado en el plasma y los hemocitos de insectos. En crustáceos, el sistema **proFO** solamente se ha detectado en el interior de los hemocitos, lo cual ha sido confirmado en el presente estudio. Adicionalmente, se encontró que la fuerza mecánica, como la centrifugación a 800 **g**, pero no la turbulencia producida por la aguja durante la toma de hemolinfa, causó la liberación del sistema **proFO** al plasma.

El uso de amortiguador de cacodilatos, conteniendo menores concentraciones de **sal** que las existentes en el plasma de los camarones, provocó la liberación de la **proFO** sin rompimiento celular, lo cual se comprobó por microscopia. La mayor concentración de **proFO** (100 %) se liberó cuando se incubaron los hemocitos en amortiguador de cacodilatos sin **NaCl**, mientras que la menor concentración (8 %), se liberó cuando se incubaron las células en amortiguador de cacodilatos conteniendo **NaCl** entre 400 y 500 **mM**.

La **proFO** y la enzima activadora (**EApFO**) pudo ser obtenida en forma estable a partir de los hemocitos, utilizando amortiguador de cacodilatos sin calcio. El uso de amortiguador de cacodilatos conteniendo entre 5 y 200 **mM** de calcio, promovió la activación de la **proFO** a FO. Las sales de magnesio y manganeso fueron menos efectivas en la promoción de esta activación. Sin embargo, la

activación por calcio se redujo por la adición de un inhibidor de tripsina (**STI**) a la solución, lo que sugiere que el mecanismo que involucra al calcio es **catalizado** por la enzima activadora de la **proFO**.

El uso de amortiguador de cacodilatos sin calcio y sin **NaCl**, y la centrifugación a 15,900 **g**, produjo mejores resultados en comparación con la técnica previamente usada para producir SLH. El uso de esta técnica permitió la obtención de **proFO** de manera mas **fácil**, rápida y produjo muestras, probablemente con menor concentración de proteínas contaminantes no relacionadas con el sistema **proFO**.

La **proFO** del camarón café **fué** activada por **β -glucanos**, pero no por LPS. La activación por **glucanos** **fué** dependiente del número de lote y la concentración del reactivo. Algunas bacterias marinas y levaduras marinas no activaron la **proFO** libre de células.

La tripsina bovina, quimotripsina bovina y la papaína activaron la **proFO**, demostrando que una **vía** enzimática está involucrada en la producción de FO. Sin embargo, se observó una **vía** adicional cuando se activó la **proFO** con etanol o SDS aun en presencia de **STI**.

En un sistema alternativo, la **proFO** se encontró en el sobrenadante cuando se incubó una suspensión de hemocitos en

SIC conteniendo **β -glucanos**, bacterias marinas o levaduras marinas. Sin embargo, los LPS no tuvieron el mismo efecto. La FO libre de células promovió la capacidad **fagocítica** de los hemocitos del camarón **café**, siendo mayor el efecto producido

por la enzima cuando se obtuvo por **centrifugación** y activada con tripsina que la FO **obtenida** por estimulación de los hemocitos por Bglucanos.

Abstract

The **proPO** system has been found in plasma and hemocytes of insects. In crustaceans, the **proPO** has been found only in the plasma cells. This has been confirmed in the present study. Additionally, it was found that **mechanical force** such as centrifugation above 800 g and not the turbulence produced by the gauge during the plasma **sampling**, promoted the **release** of **proPO** system to the plasma.

Cacodylate buffer containing lower concentration of **salts** than shrimp plasma induced the **release** of the **proPO** without cell membrane rupture, as confirmed by microscopy. The higher concentration of **proPO** (100%) was released when the hemocytes was incubated in cacodylates **NaCl-free** buffer. The lower concentration of **proPO** (about 8%); was obtained by incubating of the cells in 400 to 500 mM **NaCl**, cacodylates buffer.

It was possible to obtain the **proPO** and the activating enzyme (**EApPO**) from the hemocytes by using a **calcium-free** cacodylate buffer. Cacodylate buffer containing between 5 and 200 mM calcium promoted the activation of the **proPO** to **PO**. Magnesium and manganese salts were less effective for activation of **proPO** to **PO**. However, calcium activation was reduced by adding **STI** to the solution, suggesting that a calcium mediated mechanism is involved directly with the proteinase activating enzyme.

The use of cacodylate **calcium-free** and **NaCl-free** buffer and the centrifugation at 15,900 g produced better results, compared to the technique previously used for producing **HLS**. The latter technique to obtain the **proPO** was easier and faster and probably produced samples containing a lower concentration of contaminant proteins, unrelated to the **proPO** system.

The brown shrimp **proPO** was activated by **β -glucans**, but not by **LPS**. Glucans activation was highly dependent on the lot number and concentration of the reagents. In contrast, several marine bacteria and yeast failed to activate the **free-cell proPO**.

Bovine trypsin, bovine chemotrypsin and papain activated the **proPO**, showing a enzymatic pathway involved in the production of **PO**. Furthermore, a different, activation pathway by **ethanol** and **SDS**, even in the presence of **STI** was very clearly demonstrated.

In a separate approach, the **PO** was found in a cell-free solution, when the hemocytes were incubated in a **SSS** containing **β -glucans**, marine bacteria or marine yeast. However, **LPS** did not have the same effect. The **cell-free PO** promoted the phagocytic ability of the hemocytes with a stronger effect produced by the enzyme obtained by cell centrifugation and trypsin addition, than the **PO** obtained by stimulating the hemocytes by **β -glucans**.

Introducción

La captura y comercialización del camarón es una de las actividades mas rentables en México. La saturación de la capacidad de la flota camaronera y el atractivo mercado norteamericano están estimulando en México el cultivo del camarón.

Debido a la demanda mundial de este recurso, las técnicas de cultivo están perfilándose hacia aquellas de carácter intensivo, las cuales generan una alta producción. Sin embargo, en los cultivos intensivos se aumenta la probabilidad de desarrollo y transmisión de patógenos debido a la alta densidad de población. En estos cultivos, las enfermedades pueden producir grandes pérdidas económicas (Lightner, 1983). Por ello, la determinación de la forma de-transmisión así como un diagnóstico y tratamiento temprano son muy importantes para mantener las enfermedades bajo control (Neal, 1973).

Durante el cultivo de! camarón, el mayor riesgo de que se contraigan enfermedades y por lo tanto se eleve la mortalidad, se presenta en la etapa larva! debido, en parte, a que el sistema de defensa aún no esta completamente desarrollado (Vargas-Albores *et al.*, 1992).

El interés por conocer los mecanismos de defensa en invertebrados se debe, por un lado, a que los insectos son vectores de enfermedades humanas. Además, estos

compiten con el hombre por sus recursos animales y vegetales. Los métodos que hasta la fecha existen para controlar el daño causado por los insectos son peligrosos para el medio ambiente y para el hombre. Debido a esto, la disminución selectiva de los mecanismos de defensa de los insectos, podría ayudar al control de plagas. Por otro lado, el estudio de la inmunidad en crustáceos y moluscos ha tomado interés, debido a la importancia económica de estos animales en la acuicultura, donde una adecuada estimulación de los mecanismos de defensa de los organismos en cultivo podría reducirles la posibilidad de contraer enfermedades infecciosas.

La capacidad para distinguir lo propio de lo extraño es un fenómeno universal en el reino animal. En los vertebrados, se ha demostrado que esta acción es realizada por células y anticuerpos (Bach, 1984). Sin embargo, en invertebrados, aparentemente incapaces de producir inmunoglobulinas, las bases moleculares de! reconocimiento y eliminación de patógenos no son totalmente conocidas (Ratcliffe *et al.*, 1985; Ratcliffe, 1985).

La función básica de un sistema de defensa es el mantenimiento de la integridad biológica del individuo, lo cual se logra por una adecuada capacidad para diferenciar lo propio de lo extraño. Esta característica permite eliminar partículas,

parásitos e incluso células propias alteradas o envejecidas. El fenómeno parece ser dependiente del reconocimiento de diferencias **físicas, químicas, fisicoquímicas** y biológicas en las células (**Lackie**, 1980) y el proceso de defensa es iniciado por una célula o molécula que reconoce un determinado patrón de no propiedad (Coombe et al., 1984).

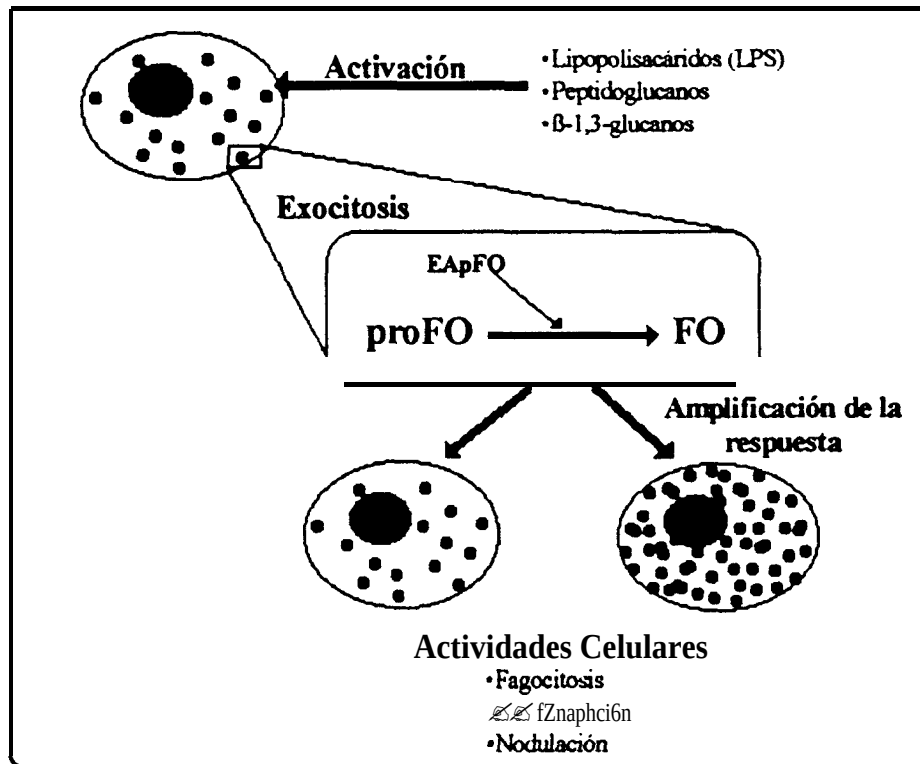
En invertebrados, el reconocimiento de lo extraño puede desencadenar varios fenómenos 'de defensa, incluyendo **coagulación** masiva, fagocitosis, encapsulamiento, **melanización** y eliminación de material extraño (Vasta y Marchalonis, 1983; Ratcliffe, 1985; Ratcliffe et al., 1991). Dentro de las moléculas capaces de unirse al material extraño y desarrollar **respuestas** efectoras de eliminación se encuentran: las aglutininas (hemaglutininas), precipitinas, factores bactericidas, **bacteriolisinas**, hemolisinas, opsoninas, **lisozimas** y otros factores **séricos** (Cenini, 1983; Vasta y Marchalonis, 1983; **Ratanapo** y Chulavatnatol, 1990; **Roch et al.**, 1991; Vargas-Albores et al., 1992; Guzmán et al., 1993; Iketani y Morishima, 1993; Morishima et al., 1994; **Suzuki y Mori**, 1994).

Los grupos de invertebrados que mas se han estudiado son los moluscos y los artrópodos. Dentro de los artrópodos, son los insectos y los **crustáceos** los grupos de quienes **más** se conoce su sistema de defensa. En relación a los mecanismos de **defensa** de los crustáceos, se han descrito algunos factores que son efectivos contra infecciones causadas por virus (**McCumber y Clem**, 1977; **McCumber et al.**, 1979), bacterias (Evans et al., 1968; 1969; Tyson y Jenkin, 1973; **Söderhäll et al.**, 1986; Adams, 1991; Vargas-Albores et al., 1993b; Chisholm y Smith, 1995) y

hongos (**Nyhlén y Unestam**, 1980). Sin embargo, muy pocos de ellos se han caracterizado, dentro de los cuales se encuentran: las aglutininas, aisladas de camarón café (Vargas-Albores et al., **1983b**) y de langostino (**Kopáček et al.**, 1993); así como un factor de adhesión celular, el cual se aisló de langostino y promueve el encapsulamiento (Johansson y **Söderhäll**, 1988; Kobayashi et al., 1990).

El sistema de la profenoloxidasas (**proFO**), ha sido propuesto como un poderoso sistema de reconocimiento y defensa en invertebrados (**Söderhäll**, 1982) y se encuentra empaquetado en gránulos, dentro de las células sanguíneas o hemocitos. La degranulación y la liberación de factores celulares inducida por la presencia de material extraño, son las señales mas importantes de la activación (Smith y **Söderhäll**, 1983 b).

El modelo de activación del sistema **proFO** (Esquema 1), propuesto por Johansson y **Söderhäll** (1989), involucra primero una estimulación a través de la membrana celular de los hemocitos. La estimulación puede llevarse a cabo por moléculas que contienen **sacáridos** como peptidoglucanos (**Brookman et al.**, 1989) y **lipopolisacáridos** (LPS) (**Söderhäll y Hall**, 1984) de la pared celular de bacterias, así como por **β -1,3-glucanos** (Smith y **Söderhäll**, 1983b) que se encuentran en hongos, levaduras y algas. Los hemocitos estimulados liberan el contenido granular (degranulación) y la **proFO** es convertida en enzima activa denominada **fenoloxidasas** (FO: EC.1.10.13.1; o-difenol: oxígeno óxido-reductasa) por intervención de una proteinasa llamada enzima activadora de la **proFO** (EApFO).



Esquema 1: Modelo de activación del sistema **proFO** modificado de Johansson y Söderhäll (1998).

Los productos de la activación del sistema **proFO** presentan actividades biológicas tales como **melanización**, promoción de fagocitosis (**opsonización**), adherencia celular y estímulo de otros hemocitos pro-

moviendo la degranulación (Söderhäll y Ajaxon, 1982; Smith y Söderhäll, 1983a; Ashida y Söderhäll, 1984; Johansson y Söderhäll, 1985; Ratcliffe et al., 1991).

Antecedentes

El sistema **proFO** involucra factores celulares y humorales que **difícilmente** pueden ser separados. La participación de las células (hemocitos) es selectiva y no todos los tipos de hemocitos participan directamente en la eliminación de parásitos. Basados en criterios morfológicos (Martin y Graves, 1985; Martin *et al.*, 1987) y citoquímicos (Hose *et al.*, 1987; 1990), en crustáceos se han descrito tres poblaciones de hemocitos denominados: hemocitos hialinos, hemocitos de gránulos pequeños o semigranulares y hemocitos de **gránulos** grandes o granulares.

En el camarón café (*Penaeus californiensis*), también se han observado y descrito tres poblaciones de hemocitos **morfológicamente** diferenciables, los cuales **presentan** adherencia al vidrio y son capaces de ingerir eritrocitos de ratón tratados con glutaraldehído (Vargas-Albores, 1992).

En los crustáceos, los hemocitos se encuentran circulando en la hemolinfa o se presentan adheridos a tejidos (Johnson, 1987) y son capaces de reconocer y responder contra materiales extraños, con actividades como fagocitosis, **encapsulamiento** y **formación** de nódulos (Ratner y Vinson, 1983; Söderhäll *et al.*, 1986; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994).

Las diferentes poblaciones de hemocitos de crustáceos se han podido separar y pu-

rificar utilizando gradientes de densidad de Percoll^{MR} (Smith y Söderhäll, 1983a; Söderhäll y Smith, 1983; Hose y Martin, 1989), lo que ha permitido determinar la función de cada una de ellas. Así, Hose y Martin (1989) observaron que los hemocitos hialinos de *Sicyonia ingenta* participan en los procesos de coagulación mas que en la fagocitosis. Sin embargo, en otros crustáceos este tipo de hemocitos se identifica por su capacidad para fagocitar y encapsular material extraño (Söderhäll y Smith, 1986; Söderhäll *et al.*, 1986; Johansson y Söderhäll, 1989).

Los hemocitos granulares y **semigranulares** presentan diferencia; en cuanto al tamaño y contenido enzimático de sus gránulos. Los hemocitos granulares tienen un citoplasma con gránulos grandes y poco densos que contienen factores de coagulación (**coagulógeno**, factor C y proenzima de coagulación), **así** como un factor **anti-LPS** (Iwanaga *et al.*, 1992; Shigenaga *et al.*, 1993). Por su parte, los hemocitos semigranulares presentan gránulos citoplasmáticos pequeños y muy densos. los cuales contienen factores **anti-microbianos** denominados taquiplesina y polifemusina (Iwanaga *et al.*, 1994). Ambas poblaciones de hemocitos (granulares y **semigranulares**) contienen el sistema **proFO** empaquetado en sus gránulos citoplasmáticos (Johansson y Söderhäll, 1989; 1992; Smith y Söderhäll, 1991).

Hasta la fecha, se ha detectado la presencia de **proFO** en el interior de los **hemocitos** granulares de insectos (Ratcliffe, 1985; Ratcliffe *et al.* 1985; Leonard *et al.*, 1985a; 1985b; Brookman *et al.*, 1989) y crustáceos (Söderhäll y Smith, 1983; Johansson y Söderhäll, 1989). En insectos, el sistema **proFO** también ha sido detectado libre en el plasma (Ashida, 1981; Saul *et al.*, 1987; Saul y Sugumaran, 1988; Bréhelin *et al.*, 1989); pero en los crustáceos, aparentemente, se encuentra solamente en el interior de los hemocitos.

La principal enzima del sistema **proFO** es la fenoloxidasas, la cual es convertida a su forma activa a partir de **proFO** y es responsable de la **melanización**, además de la estimulación de otros factores celulares. El sistema **proFO** ha sido propuesto como mecanismo de reconocimiento y defensa en crustáceos e insectos (Ratcliffe *et al.*, 1984; Dularay y Lackie, 1985; Leonard *et al.*, 1985a; Rowley y Rahmet-Alla, 1990; Johansson y Söderhäll, 1989; Söderhäll, 1982; 1992; Söderhäll *et al.* 1994).

La activación del sistema **proFO** por **β -glucanos** es un fenómeno generalizado, dependiente de la dosis (Smith y Söderhäll, 1983b; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994). Las células bacterianas completas también son capaces de activar eficientemente el sistema **proFO** (Ashida y Yamazaki, 1990). Sin embargo, la activación del sistema **proFO** por LPS no siempre es posible y se han detectado diferentes respuestas entre insectos (Ashida y Yamasaki, 1990; Ratcliffe *et al.*, 1991) e invertebrados marinos (Smith y Söderhäll, 1991). En algunos insectos, incluyendo *Bombyx mori* (Yoshida y Ashida, 1986) y *Sarcophaga peregrina* (Saul y Sugumaran, 1988), los LPS no activan el sistema **proFO** *in vitro*, mien-

tras en otros tales como *Manduca sexta* (Saul y Sugumaran, 1987) y *Locusta migratoria* (Bréhelin *et al.*, 1989), ocurre una rápida y fuerte activación.

Además, el sistema **proFO** ha probado ser efectivo contra parásitos, favoreciendo el encapsulamiento de *Psorospermium haeckeli* por hemocitos de langostino (Vranckx y Durliat, 1981). Cerenius *et al.* (1991) encontraron que la **proFO** de un lisado de hemocitos de langostino fué activada con un extracto del mismo parásito. Por otra parte, Thörnqvist y Söderhäll (1993) pudieron observar degranulación en células semigranulares de langostino, como respuesta a la inyección de extractos de *Psorospermium haeckeli*.

En el modelo de activación del sistema **proFO**, la activación por **β -glucanos** y LPS parecía depender de un receptor de membrana con afinidad por estas moléculas. Sin embargo, recientemente se han detectado proteínas solubles en el plasma de crustáceos, las cuales se unen a **β -glucanos** y LPS. La proteína que se une a **β -glucanos**, (**β -glucan binding protein: BGBP**) se ha logrado purificar a partir del plasma de *Pacifastacus leniusculus* (Duvic y Söderhäll, 1990), *Astacus astacus* y *Procambarus clarkii* (Duvic y Söderhäll, 1993) y *Carcinus maenas* (Thörnqvist *et al.*, 1994), se presenta como un monómero con masa molecular de 95- 100 kDa (Söderhäll *et al.*, 1994) y es una molécula que puede inducir degranulación (Barracco *et al.*, 1991). Una proteína similar también ha sido detectada en el camarón café (Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 1994) y tiene propiedades químicas y biológicas similares a la del langostino (Vargas-Albores *et al.*, 1995).

Por otra parte, Vargas-Albores *et al.* (1993b), lograron aislar una **aglutinina** de hemolinfa de camarón café, la cual presenta afinidad por LPS y es capaz de aglutinar bacterias Gram negativas. Esta proteína tiene una masa molecular de **170-180 kDa** y está formada por 4 subunidades de **41 kDa**. De la misma manera, Kopácek *et al.* (1993), aislaron del plasma de langostino *Pacifastacus leniusculus*, una proteína de **420 kDa** que presenta, afinidad por LPS. Así mismo, Murali *et al.* (1994) detectaron en el suero del cangrejo hermitaño (*Diogenes affinis*), una proteína que mostró especificidad por carbohidratos que contienen grupos acetilo, y que presenta afinidad por LPS. Sin embargo, no parece haber relación estructural y/o funcional entre ellas. Además, estas proteínas no activan el sistema **proFO**.

Los estudios sobre activación del sistema **proFO** han permitido aislar la enzima que transforma a la **proFO** en su forma activa. Esta enzima, denominada enzima activadora de la **proFO** (**EApFO**), ha sido purificada de los hemocitos del langostino, *P. leniusculus* (Aspán *et al.*, 1990)

e identificada como una serino-proteinasa, con una masa molecular de aproximadamente **35 kDa**.

La enzima **proFO** también puede ser activada, por solventes orgánicos, detergentes o calor (Ashida y Söderhäll, 1984; Ratcliffe *et al.*, 1985), sugiriendo un mecanismo de activación diferente a la proteólisis.

Por su parte, el sistema **proFO** ha sido detectado en el camarón café (Vargas-Albores, 1992; Vargas-Albores *et al.*, 1993a) y se ha propuesto como un mecanismo de defensa. Sin embargo, no se tiene información sobre los factores que lo activan, ni cual es su efecto sobre actividades celulares. Por ello, se hace necesario establecer cuales son los componentes y mecanismos que participan en el funcionamiento del sistema **proFO** de camarón y generar el conocimiento que permita proponer metodologías tendientes a controlar enfermedades producidas por agentes infecciosos intracelulares (bacterias y virus) y parásitos, donde el sistema celular tiene una participación importante en su eliminación.

Justificación

La creciente demanda de camarón, no solo en **México** sino en todo el mundo, ha fomentado la creación de centros **productores** de estos crustáceos. El cultivo de camarón **café** (*Penaeus californiensis*) ha tomado interés debido a que presenta períodos reproductivos durante todo el **año** y aparentemente es más resistente a enfermedades. Sin embargo, en lo general, las enfermedades infecciosas son un problema que afecta fuertemente la producción. Las enfermedades que afectan mas **frecuentemente** al camarón son las virales, incluyendo: el virus de la infección **necrótica hematopoiética** e hipodérmica **INHH**; *Baculovirus penaei*, **BP** y *Parvovirus hepatopancreático*, **PVH**. Aunque el camarón café ha sido menos afectado por estos virus (Lightner, 1983; 1992), no ha quedado claro si se debe a una resistencia natural o porque el nivel de desarrollo del cultivo no está tan avanzado como en el camarón blanco o el camarón azul.

Debido al interés que se tiene por intensificar el cultivo del camarón café, la prevención de epizootias es una parte fundamental para el éxito de estos cultivos. Sin embargo, hasta la fecha no se tiene la tecnología para lograrlo. Por ello, el conocimiento de, las bases moleculares involucradas en los procesos de defensa de estos crustáceos permitirá el entendimiento de sus respuestas de defensa y puede llevarnos a intentar la manipulación de la resistencia a enfermedades, para prevenir padecimientos virales, bacterianos y parasitarios que afectan y matan a los organismos en cultivo. Por otro lado, el estudio del sistema inmune del **camarón** y el **funcionamiento** de sus componentes podría explicar la resistencia o susceptibilidad a infecciones.

Objetivos

General

Evaluar la capacidad de activación del sistema **proFO** de hemocitos de camarón **café**, por moléculas y microorganismos involucrados en procesos infecciosos.

Particulares

1. Implementar una técnica para la detección de **fenoloxidasa** (FO) en microplaca de 96 pozos.
2. Definir la capacidad de compuestos microbianos de pared celular: **β -glucanos** y lipopolisacáridos, sobre el sistema **proFO** de camarón café.
3. Determinar la capacidad de células completas (bacterias y levaduras) para activar el sistema **proFO** del camarón café.
4. Evaluar el efecto de la **estimulación** del sistema **proFO** en la fagocitosis.

Metodología

Organismos

Se utilizaron ejemplares juveniles de camarón café, aparentemente sanos (sin lesiones melanizadas), con peso promedio de 10 ± 2 g, capturados del medio natural y mantenidos en el estanque de mareas del CIBNOR, bajo un régimen de recambio continuo de agua y alimentación natural. Antes de ser utilizados, y durante la fase experimental, fueron colocados en una tina de fibra de vidrio con capacidad para 1200 L, a temperatura ambiente, con recambio de agua al 60 % cada 3 días y alimento balanceado.

Bacterias

Debido a que el género *Vibrio* se reporta **comunmente** como causante de epizootias en cultivos de camarón, se utilizaron cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 13456), *Vibrio vulnificus* (ATCC 45671), *Vibrio harveyi* (ATCC 14126), *Vibrio mimicus* (ATCC 33653) y *Vibrio fisheri* (ATCC 2987). Todas las bacterias fueron cultivadas en caldo marino 2216 (Difco) durante 24 horas a 30°C, en agitación. Las bacterias se lavaron tres veces centrifugando a 800 g por 10 min y resuspendiendo en agua marina artificial estéril. Se resuspendieron en glutaraldehído al 2.5 % y se mantuvieron a 25°C por una hora. Se centrifugó a 800 g por 10 min y para bloquear el glutaraldehído

residual, el paquete se resuspendió en una solución 2 M de glicina, durante 1 hora a 25°C en reposo. Finalmente se lavaron tres veces con agua marina artificial, se resuspendieron en solución de NaCl 450 mM y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Antes de usarlas se ajustaron a 580 nm a una densidad óptica de 1.

Levaduras

Se usaron dos cepas de levaduras marinas: *Debaryomyces hansenii* y *Rhodotorula rubra*, aisladas de la costa occidental de Baja California Sur y caracterizadas en el CIBNOR de La Paz B.C.S. (Hernández-Saavedra, 1990). Las levaduras fueron inoculadas en caldo MI e incubadas en agitación a 25°C durante tres días, los cultivos fueron centrifugados y las células lavadas (tres veces) por resuspensión en agua marina artificial y centrifugación. Antes de usarse, las levaduras fueron resuspendidas en NaCl 450 mM, se contaron al microscopio utilizando la cámara de Neubauer y se ajustaron a una concentración de 40×10^6 células por mL.

Lipopolisacáridos (LPS)

Se usaron lipopolisacáridos, obtenidos comercialmente (Sigma Chem. Co.), los cuales están preparados por extracción fenólica de pared celular de bacterias

Gram negativas (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexnerii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* y *Salmonella thyposa*). Todos los LPS se diluyeron en agua **destilada** libre de **pirógenos**, a una concentración de 10 **mg/mL** y se congelaron hasta su uso. Para los ensayos de activación, se utilizó una concentración de 10 **µg/mL**.

Determinación de proteínas

Se usó el método de Lowry *et al.* (1951) para la determinación de proteínas, utilizando albúmina bovina (BSA) como referencia. La técnica básica se realizó con 50 **µL** de muestra a la cual se le adicionó 1 **mL** de reactivo alcalino. se mezcló y se adicionaron 50 **µL** de reactivo de Folin, se mezcló y se mantuvo a 25°C por 30 minutos en obscuridad. La absorbancia se midió a 750 nm.

Obtención de hemolinfa

La hemolinfa **fué extraída** con una jeringa de 1 **mL** por punción en la base de los **pleópodos**, en los límites de la región formada por el perión y el pleón, ligeramente anterior al poro genital, utilizando solución isotónica para camarón con EDTA (SIC-EDTA) previamente enfriada a 4°C, descrita por Vargas-Albores *et al.* (1993a), en una proporción de 2:1 (2 volúmenes de SIC-EDTA por cada volumen de **hemolinfa extraída**).

Obtención de hemocitos

La hemolinfa extraída se centrifugó a 15,900 **g** (15,000 rpm) por 7 s y se retiró el plasma; el paquete celular **fué resuspendido** en amortiguador de cacodilatos y

utilizado inmediatamente. Para algunos experimentos, los hemocitos se separaron centrifugando la hemolinfa a 800 **g** (2000 rpm) durante 3 **min**.

Obtención de Lisado de Hemocitos (SLH)

Se tomó una muestra de hemolinfa de 5 camarones y se centrifugó a 800 **g** (2,000 rpm) por 3 **min**. El paquete celular se resuspendió en amortiguador de **cacodilatos** con 10 **mM** de calcio. Las células se **lisaron** por ultrasonido (Cole Parmer serie 4710, modelo **CP250B**), a 20 Watts por 3 **min**, manteniendo la muestra en baño de hielo. El **lisado** se centrifugó (ultracentrífuga Beckman modelo L7, con rotor tipo 42.1) a 70,000 **g** (30,000 rpm) durante 30 **min** a 4°C y el sobrenadante, denominado sobrenadante de **lisado** de hemocitos (**SLH**), se usó como fuente de **proFO**.

Determinación de actividad Fenoloxidasa (FO)

La actividad de fenoloxidasa se determinó siguiendo el método utilizado por Leonard *et al.* (1985b). En un tubo para **microcentrífuga** siliconizado, se colocaron 100 **µL** de muestra con 100 **µL** de **L-DOPA** (3 **mg/mL** disuelta en agua, previamente agitada por 10 **min** en un **vortex**) durante 10 **min** a temperatura ambiente. La reacción se suspendió adicionando 800 **µL** de amortiguador de cacodilatos y la absorbancia se determinó en un espectrofotómetro (Beckman, modelo **DU600**) a 490 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo 0 actividad específica.

Para la detección de actividad **fenol-oxidasa** en volúmenes pequeños de muestra, se implementó el método en **micro-placa**. Para ello, 50 μL de muestra se colocaron en un pozo de microplaca y se adicionaron 50 μL de L-DOPA (3 **mg/mL** disuelta en agua) y se incubó por 10 **min** a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a 492 nm en un lector de placas (Labsystem Uniskan). Los resultados se expresaron como porcentaje relativo.

Determinación del contenido de fenoloxidasa total (proFO+FO)

En algunos estudios, la muestra se incubó con tripsina (tipo XI de **pancreas** de bovino) para asegurar la conversión total de la **proFO** a su forma activa (FO). A 50 μL de muestra, se le adicionaron 50 μL de tripsina (0.1 **mg/mL** disuelta en agua libre de pirógenos) y se incubó durante 10 **min** a 25°C. La actividad FO se determinó como se describió anteriormente. Las lecturas de absorbancia (FO total) se restaron a las obtenidas para FO con el fin de determinar la cantidad de **proFO** disponible.

Actividad Específica

La actividad específica fue definida como el cambio de absorbancia a 492 nm por mg de proteína por **min** y se calculó dividiendo las lecturas de densidad óptica, entre diez (tiempo de incubación con el sustrato) y el valor obtenido se dividió entre la concentración de proteína (en **mg/mL**).

Porcentaje Relativo

El porcentaje relativo se calculó igualando a 100 % la actividad total determinada por activación con tripsina.

Activación por compuestos químicos

Se probó la capacidad de la urea, SDS y etanol para activar la **proFO obtenida** de hemocitos de camarón café. Para ello se incubaron 50 μL de muestra, **obtenida** por centrifugación 0 por lisis (**SLH**), con 50 μL de posible activador por 30 **min**. Las concentraciones usadas fueron: urea 2 **M**, SDS al 1% y etanol absoluto. Después de la incubación se determinó la actividad de FO.

Inhibición de activación proteolítica

Para comprobar la activación por tripsina, se inhibió la activación producida por esta enzima, utilizando una solución (0.2 **mg/mL**) del inhibidor de tripsina (soybean trypsin inhibitor: **STI**). Para los experimentos se adicionaron 25 μL de **STI** a las muestras conteniendo **proFO obtenida** por centrifugación. El sistema se incubó con 25 μL de tripsina (0.1 **mg/mL**) por 30 **min** y posteriormente se determinó la concentración de FO.

Obtención de eritrocitos de ratón (GRR)

Se obtuvieron por punción ocular, 2 **mL** de sangre de ratón. se centrifugó a 500 **g** (2,000 rpm) durante 10 **min** y se eliminó el plasma. Los eritrocitos se lavaron 3 veces con **NaCl** 0.15 **M** y se **resuspendieron** en glutaraldehído al 2.5%. Las células se mantuvieron en reposo por 1 hora y se lavaron tres veces con **NaCl**

0.15 M. Para eliminar el glutaraldehído residual, los eritrocitos se resuspendieron en una solución 2 M de glicina y se incubaron durante 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con SIC y se ajustaron a una concentración de 6×10^6 células/mL por cuenta directa en microscopio, **utilizando** una cámara de Neuvauer.

Prueba de fagocitosis

La prueba de fagocitosis **fue** realizada de la siguiente forma: Se permitió la adherencia de los hemocitos al vidrio, colocando 200 μL de **hemolinfa** diluida 1:5 con SIC-calcio 5 **mM** en una placa para cultivo de tejidos de 8 pozos e incubando durante 15 **min** en cámara húmeda. Las células **fueron** lavadas dos veces con SIC y se adicionaron 100 μL de una suspensión de eritrocitos de ratón (GRR) tratados con glutaraldehído. La preparación se incubó en cámara húmeda durante 30 **min** a 37°C y 5% de CO₂. Las células

fueron lavadas 3 veces con SIC para eliminar el exceso de GRR y la preparación se fijó con 200 μL de glutaraldehído al **2.5%**, manteniéndola por 1 hora a 25°C. La preparación se lavó tres veces con SIC y para bloquear los grupos aldehído se adicionaron 200 μL de **glicina** (2 M) manteniéndose así por 30 **min** a 25°C.

La preparación se tiñó con 3 **mL** de colorante de Wright incubando 25°C durante 2 **min**. Sin eliminar el colorante, se adicionaron 3 **mL** de agua destilada, se mezcló con una pipeta **Pasteur** y se incubó a 25°C por 8 **min**. La preparación se lavó con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y se observó en el microscopio.

Análisis estadístico

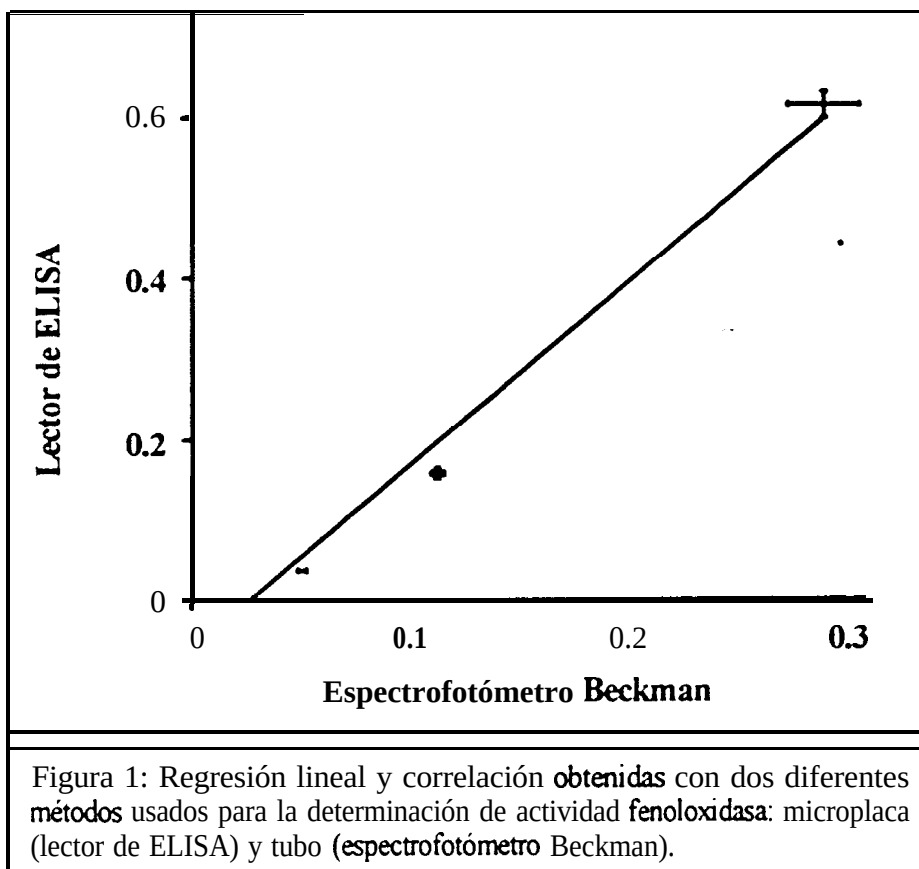
En todos los casos requeridos, se **utilizó** el análisis de **varianza** monofactorial (**ANOVA**) para determinar la **significancia**.

Resultados

Técnica en microplaca

Se **comparó** la técnica para la **determinación** de actividad FO, descrita por Leonard et **al.** (1985b) y un método en microplaca que permite el uso de volúmenes pequeños de muestra. La **actividad** FO se determinó (por **cuatrupli-**

cado) en diferentes diluciones (1:5, 1: 10, 1:50 y 1: 100) de SLH de camarón **café**. La **absorbancia** de la quinona formada se midió en un espectrofotómetro o en un lector de microplacas. Las lecturas **obtenidas** por las dos técnicas presentaron una alta correlación ($r=0.99$) y precisión (Figura 1), por lo que ambas técnicas **fueron** utilizadas indistintamente **depen-**



diendo de las condiciones o volúmenes requeridos en el ensayo.

Para determinar la sensibilidad de la **técnica en microplaca**, se probó la activación con **laminarina (1 mg/mL en cacodilatos con 10 mM de calcio)** en diferentes volúmenes de **hemolinfa (10, 30, 50 y 100 μ L)** por pozo.

Como puede observarse en la Figura 2, se obtuvo una relación lineal hasta un volumen de 50 μ L. Utilizando 100 μ L se obtienen valores similares a los obtenidos con 50 μ L. Por otro lado, con esta técnica es posible detectar actividad FO utilizando volúmenes tan pequeños de muestra como 10 μ L. En todos los ensayos

posteriores, se utilizó 50 μ L como volumen de muestra.

Detección de proFO en plasma

En insectos, el sistema **proFO** se encuentra tanto en los hemocitos, como en el plasma (Saul *et al.*, 1987; Brookman *et al.*, 1989). mientras que en los crustáceos, solamente se ha detectado en los hemocitos (Johansson y Söderhäll, 1989). En el camarón café, Vargas-Albores (1992) detectó la presencia del sistema **proFO** solamente en el interior de los hemocitos. Sin embargo, en este trabajo, durante la

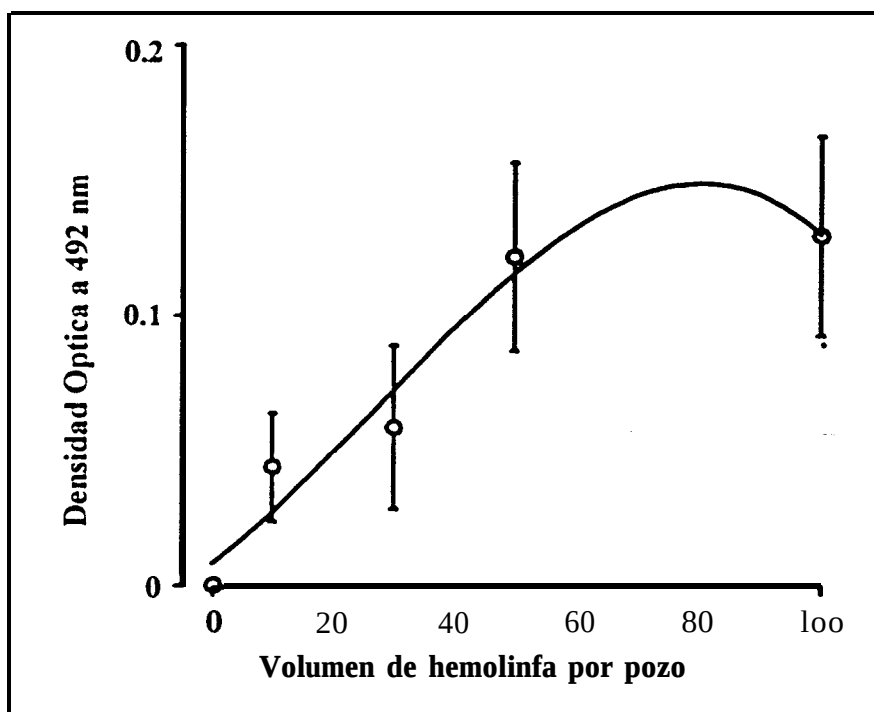


Figura 2: Valores de densidad óptica obtenidos con diferentes volúmenes de muestra, utilizando la técnica de **microplaca** para **determinar** actividad fenoloxidas.

separación de los hemocitos por **centrifugación** (15,900 g por 7 s) se detectó en el plasma la presencia de la enzima inactiva (**proFO**), la **cual fue** determinada por incubación del **plasma** con **tripsina** y midiendo la actividad FO.

Para explicar la presencia de **proFO extracelular**, se probó el uso de diferentes calibres de aguja para la extracción de la **hemolinfa**. Se usaron grupos de 10 animales y se sangraron con agujas de diferentes calibres: 25, 22, 21 y 20. La **hemolinfa obtenida** se centrifugó a 15,900 g por 7

seg y se determinó la actividad de FO y la presencia de **proFO** en el plasma, usando la técnica en **microplaca**.

No se encontraron diferencias significativas en el uso de agujas calibre 25, 22 y 21, mientras que con aquella de calibre 20, se **observó un incremento significativo** de **proFO** en plasma ($p < 0.05$). Los valores detectados de FO fueron **significativamente menores** ($p < 0.001$) respecto a los de **proFO**, lo que sugiere que la enzima se liberó al plasma principalmente en forma inactiva (Figura 3).

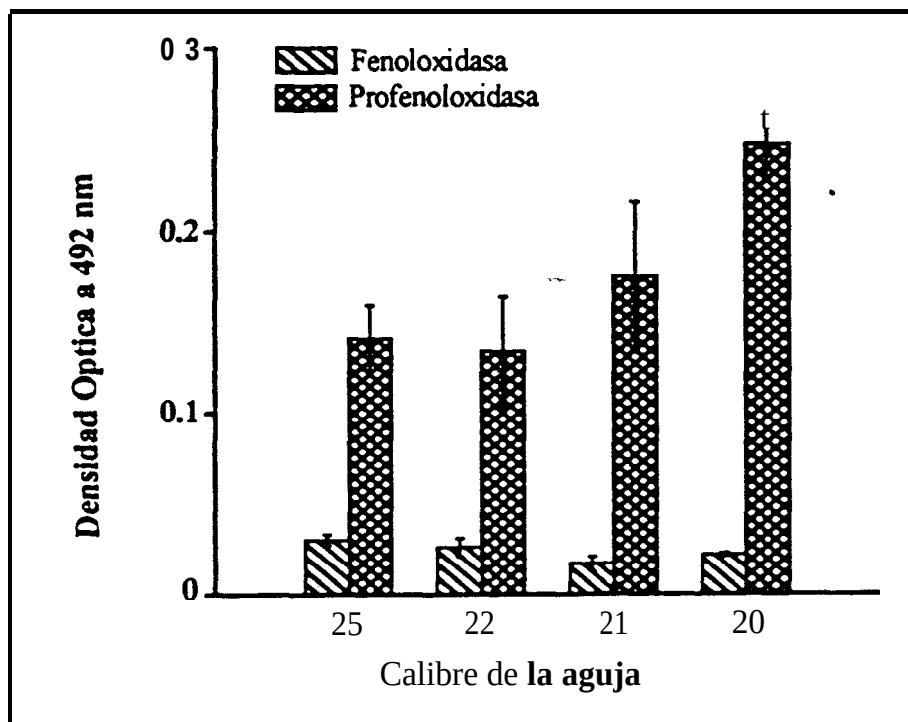


Figura 3: Efecto del calibre de la aguja usada en la extracción de la hemolinfa, sobre la liberación de **proFO** al plasma, medida como densidad óptica

Tabla 1: Influencia del efecto mecánico generado por la aguja, en la liberación de pro-fenoloxidas al plasma. Se usó aguja calibre 25.

Prueba	Con aguja	Sin aguja
FO	0.041 ± 0.007	0.039 ± 0.003
proFO	0.214 ± 0.132	0.203 ± 0.138

Los resultados expresan la media de la densidad óptica a 492 nm de 6 determinaciones ± desviación patrón.

Adicionalmente, se probó el efecto mecánico generado por la aguja, en la liberación de proFO al plasma. Para esto, al momento de colocar la hemolinfa en el tubo de ensayo, se dejó o retiró la aguja (calibre 25) de la jeringa. Como se puede ver en la Tabla 1, no se encontraron diferencias significativas por la presencia de la

aguja, indicando que el efecto mecánico generado por el pequeño calibre de la aguja usada no tiene influencia en la liberación de la proFO al plasma.

Al no encontrar diferencias importantes por el calibre de la aguja usada, se investigó el efecto de la velocidad de centri-

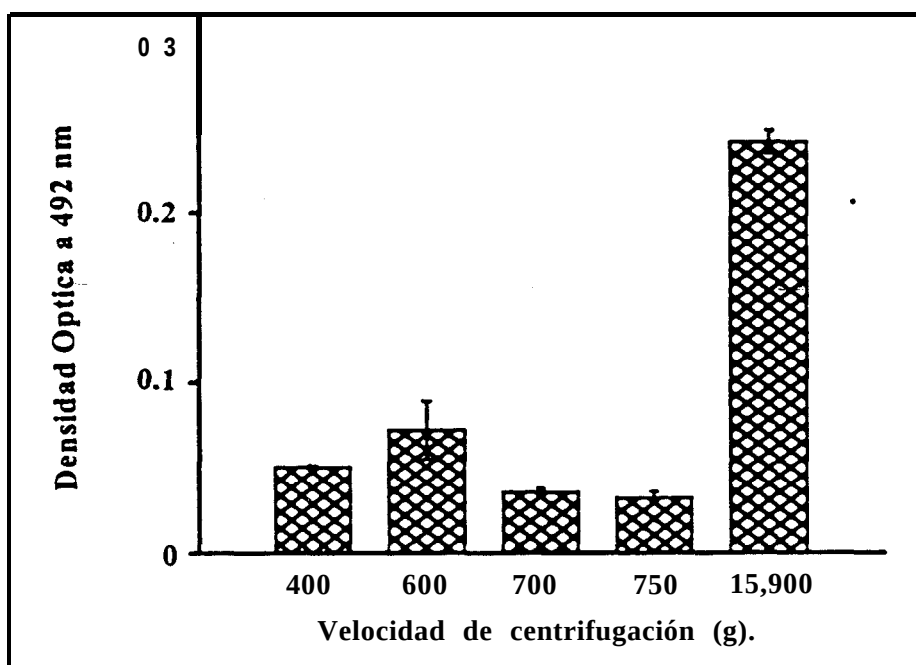


Figura 4: Efecto de la velocidad de centrifugación en la liberación de proFO, medida como densidad óptica, al plasma durante el proceso de separación de hemocitos. Los valores representan la media de tres determinaciones ± desviación patrón.

Tabla 2: Efecto del amortiguador usado en la obtención de **lisado** de **hemocitos** de camarón **café** sobre **la activación** de la **proFO**.

Composición del amortiguador	FO	proFO
Cacodilatos + 100 mM Ca^{2+} , pH 7.0	24.9 $\pm$ 5.9	75.1 $\pm$ 5.9
Cacodilatos + 450 mM NaCl, pH 7.0	8.9 $\pm$ 4.1	91.1 $\pm$ 4.1
SIC + 100 mM Ca^{2+} , pH 7.3	2.2 $\pm$ 2.6	97.8 $\pm$ 2.7

Los valores **expresan** el porcentaje de actividad medido en 4 muestras $\pm$ desviación **patrón**.

fugación en la liberación de la **proFO** de los hemocitos. Los valores de **proFO** encontrados en plasma fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) cuando la **hemo-linfa** **fue** centrifugada a 15,900 g (centrifuga **Eppendorff**), que cuando la muestra se centrifugó a 800, 700, 600 y 400 g (Figura 4). Debido a los resultados anteriores, en todos los ensayos se separaron los hemocitos por centrifugación a 800 g por 3 **min** con lo que se evitó la liberación del sistema **proFO** al plasma.

Activación de **proFO** de sobrenadante de lisado de hemocitos (SLH)

Para los estudios sobre activación del sistema **proFO** en crustáceos, se ha utilizado el SLH como fuente de **proFO** (Söderhäll y Hall, 1984; Cerenius *et al.*, 1991; Smith y Söderhäll, 1991; Vargas-Albores *et al.*, 1993a).

Utilizando una metodología similar para la preparación de **lisado** de hemocitos, se preparó SLH de hemocitos de camarón **café**. Sin embargo, con estas condiciones se obtuvieron preparaciones con un alto porcentaje de activación **espontánea**, determinada por la actividad FO. En

busca de la mejor manera de obtener un SLH con un sistema **proFO** estable, **se** probaron tres amortiguadores diferentes: Cacodilatos + 100 mM calcio, Cacodilatos + 450 mM NaCl y SIC + 100 mM calcio. Los resultados mostraron que el uso de SIC + 100 mM calcio y Cacodilatos + 450 mM NaCl, permiten la recuperación del sistema **proFO** con bajo porcentaje de activación espontánea, por lo que éstos se consideraron como los amortiguadores más adecuados para la obtención del SLH (Tabla 2).

En insectos y **crustáceos**, ‘además de ser activado por compuestos de pared celular de hongos (Söderhäll y Unestam, 1979; Leonard *et al.*, 1985b) y bacterias (Ashida *et al.*, 1983; Söderhäll y Häll, 1984; Saul y Sugumaran, 1987), el sistema **proFO**, particularmente la enzima **proFO**, puede ser activada por detergentes y solventes orgánicos (Ashida y Söderhäll, 1984; Leonard *et al.*, 1985b; Ratcliffe *et al.*, 1985). En el camarón **café** se probó **la** activación de la **proFO** de SLH por SDS, urea y etanol, encontrando que el SDS y **el** etanol produjeron una activación significativa ($p < 0.05$), mientras que la urea no tuvo ningún efecto (Tabla 3).

Tabla 3: **Activación de proFO de SLH obtenido en *cacodilatos* con 5 mM de calcio, a partir de hemocitos de camarón *café*.**

Activador	Lisado (Actividad específica)
Control	0.046 ± 0.026
Químicos	
1. Etanol	0.082 ± 0.012*
2. SDS	0.184 ± 0.071*
3. Urea	0.047 ± 0.026
Enzimas	
1. Papaína	0.345 ± 0.107"
2. Quimotripsina	0.409 ± 0.068"
3. Tripsina	0.440 ± 0.058*
Sacáridos microbianos	
1. Laminarina	0.081 ± 0.030*
2. LPS (<i>E. coli</i>)	0.056 ± 0.036
3. LPS (<i>P. aeruginosa</i>)	0.044 ± 0.013
4. LPS (<i>S. marcescens</i>)	0.054 ± 0.020

* Activación **significativa** ($P < 0.05$) respecto al control, definida por ANOVA. Los resultados **expresan** la media de cuatro replicas ± desviación patrón.

Por otro lado, cuando se probó la activación por β -glucanos (laminarina) y LPS en un SLH, solamente la **laminarina** presentó activación significativa ($p < 0.05$) sobre el sistema **proFO** (Tabla 3). Sin embargo, al probar tres lotes diferentes de **laminarina**, se observaron variaciones cuantitativas en el estímulo (Tabla 4) y la activación del sistema **proFO** fue dependiente de la dosis de laminarina (Figura 5).

Utilizando el lote que produjo la mejor activación (73H3815), se alcanzó un máximo de activación a partir de 5 mg/mL. Sin embargo, independientemente del lote, la mayor actividad se logra en un intervalo de 1 a 10 mg/mL (Figura 5).

Al no poder activar el sistema **proFO** con LPS y considerando que en insectos se logra activar utilizando células completas de bacterias (Ashida *et al.*, 1983; Ashida y Yamazhaki, 1990), se probó la activación del sistema **proFO** en un SLH de camarón *café* por microorganismos. Para ello se utilizaron bacterias (*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio harveyi*) y levaduras (*Debaryomyces hansenni* y *Rhodotorula rubra*) marinas. A 50 μ L de SLH se les adicionaron 50 μ L de la suspensión de bacterias o levaduras y la mezcla se incubó durante 30 min. La suspensión se centrifugó a 800 g durante 5 min y la actividad de FO se midió en el sobrenadante. En ningún caso se obtuvieron evidencias de activación adicional

Tabla 4 Activación de **proFO** con laminarina (1 g/mL), obtenida de tres diferentes lotes.

# de Lote de laminarina (Sigma Chem. Co.)	Porcentaje relativo de activación
44H3924	8.7 ± 3.2
110H3841	19.1 ± 2
73H3815	29.2 ± 5.1

Los valores representan la media de **tres determinaciones** ± desviación patrón.

del sistema **proFO** por la presencia de microorganismos.

En el modelo de activación del sistema **proFO** en insectos y otros artrópodos, se ha descrito la participación de una **serin-**

proteínasa como la **molécula** responsable de activar la **proFO** (Saul y Sugumaran, 1987; Johansson y Söderhäll, 1989; 1992; Aspán *et al.*, 1990; Yonemura *et al.*, 1991; Söderhäll *et al.*, 1994). En este trabajo se probó el efecto de tres enzimas

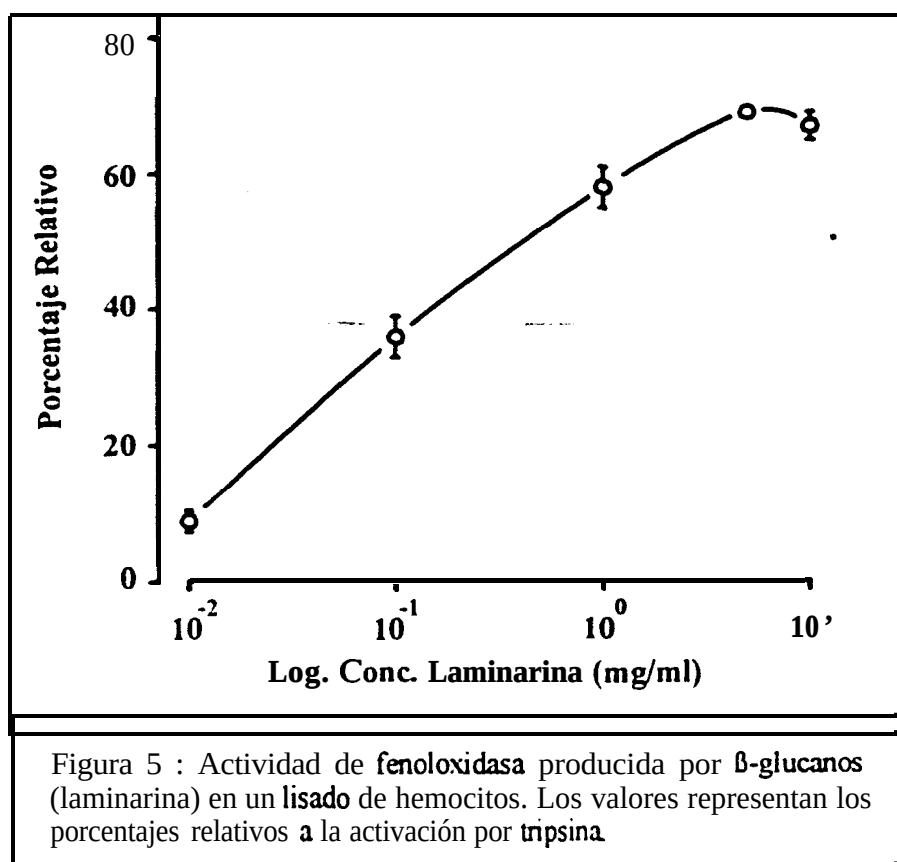


Tabla 5: Efecto de la salinidad en la liberación del sistema **proFO** de hemocitos de camarón **café**

Concentración de NaCl (mM)	Actividad (Porcentaje relativo)
0	100
50	41.0 ± 5.3
100	56.7 ± 10.0
200	44.8 ± 12.5
400	21.6 ± 10.0
450	9.8 ± 5.3
600	41.4 ± 15

Los valores representan la media de cuatro determinaciones ± desviación patrón

proteolíticas (**tripsina**, quimotripsina y papaína) sobre la **proFO** de SLH. Aunque la mayor activación se obtuvo con tripsina (Tabla 3), las tres enzimas fueron capaces de hidrolizar la **proFO** y producir FO activa.

Influencia de la salinidad

En algunos experimentos se había observado que el sistema **proFO** podía ser liberado de los hemocitos cuando las células se

suspendían en un regulador de baja salinidad y se centrifugaban a 15,900 g. Además se demostró que la velocidad de centrifugación tiene un efecto en la liberación del sistema **proFO** (Figura 4). Por ello, se probó la influencia de la salinidad en la liberación del sistema **proFO** de hemocitos del camarón **café**, resuspendiendo el paquete celular en amortiguador de cacodilatos con diferentes concentraciones de **NaCl** (0, 50, 100,

Tabla 6: Valores de actividad **proFO**, medida como densidad óptica, obtenidos con 450 mM de **NaCl** o en ausencia de esta sal, cuando los hemocitos fueron sometidos a velocidades de 600 y 15,900 g.

Conc. NaCl (mM)	600 g	15,900 g
0	0.62 ± 0.09	0.65 ± 0.08
450	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.03

Los valores representan la media de 4 pruebas ± desviación patrón.

200, 400, 450, 600 mM), seguido de **centrifugación** a 15,900 g por 1 min. Como se observa en la Tabla 5, la **máxima** liberación del sistema **proFO** se obtiene en ausencia de **NaCl**, mientras que con salinidades entre 400 y 500 mM de **NaCl**, la cantidad de enzima liberada es menor.

Cuando se comparó la resuspensión de hemocitos en amortiguador sin o con (450 mM) de **NaCl** y centrifugando a dos velocidades diferentes (600 y 15,900 g), se encontró que la salinidad del medio tiene mayor influencia en la liberación del sistema **proFO** que la velocidad de **centrifugación** (Tabla 6).

Centrifugado

A pesar de que el SLH resultó una buena fuente de **proFO**, estas preparaciones eran inestables **observándose** activación **espontánea** durante el proceso de obtención de la muestra. Se ha determinado tanto en insectos (Ashida *et al.*, 1983; Ashida y Söderhäll, 1984) como en crustáceos (Söderhäll y Hall, 1984; Kobayashi *et al.*, 1990), que altas concentraciones de calcio

(100-200 mM) estabilizan el sistema **proFO** evitando la activación espontánea. La obtención del sistema **proFO** por centrifugación en amortiguador de **cacodilatos** con 20 mM de calcio se comparó con la obtención en las mismas **condiciones** pero sin calcio, observándose una activación **espontánea** cuando se utilizó calcio, mientras que en las muestras **obtenidas** sin calcio, se obtuvo un sistema **proFO** estable (Tabla 7). De la **misma** forma que el calcio, el magnesio y el manganeso activaron la **proFO** aunque en menor grado (aproximadamente el 30 %) respecto al calcio (Tabla 7).

Para determinar la influencia de la **concentración** de calcio en la estabilidad del sistema **proFO** del camarón, se obtuvo una muestra por centrifugación de **hemocitos** en ausencia de calcio. Diferentes alícuotas de esta muestra se incubaron con 0, 5, 10, 20, 100 y 200 mM de **CaCl₂** durante 30 min, antes de determinar la actividad FO. Como se puede ver en la Figura 6, La presencia de calcio, desde 5 mM, induce la activación espontánea, con un **máximo** a partir de 20 mM.

Tabla 7: Efecto del calcio, magnesio y manganeso en la **activación** del sistema **proFO**.

Ión	FO (Porcentaje relativo)
Cacodilatos	2.48 ± 0.82
Calcio 20 mM	24.7 ± 12.7
Magnesio 20 mM	6.8 ± 1.9
Manganeso 20 mM	7.6 ± 2.2

Los valores representan el porcentaje relativo a la activación por tripsina ± desviación patrón.

De acuerdo a los resultados anteriores, se propuso una nueva metodología para la obtención del sistema **proFO** de **hemocitos** de camarón **café**, la cual se realizó de la siguiente forma: Se obtuvieron 1.5 mL de hemolinfa y se centrifugó a 800 g por 3 min a 4°C, los hemocitos se **resuspendieron** en 1 mL de amortiguador de **cacodilatos** sin calcio y se centrifugaron a 15,900 g por 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó en **refrigeración** hasta su uso y se utilizó como **fente** de **proFO**.

Mediante esta metodología es posible **obtener** una **preparación** del sistema **proFO** estable de una manera rápida y sencilla. Además, el centrifugado de hemocitos

contiene menos proteínas contaminantes no relacionadas con el sistema **proFO**, que el tradicionalmente usado SLH.

Activación de **proFO** obtenida por Centrifugación

Los mismos activadores ensayados con SLH fueron probados con preparaciones de **proFO** obtenidas por centrifugación. De la misma manera que con el **SLH**, las tres enzimas **proteolíticas**, los **β -glucanos** y el SDS, lograron activar la **proFO**, mientras que **ni** los LPS, el etanol ni la urea, presentaron un estímulo significativo respecto al control (Tabla 8). Las células completas de bacterias y levaduras marinas tampoco lograron activar el **sistema proFO** en estas muestras.

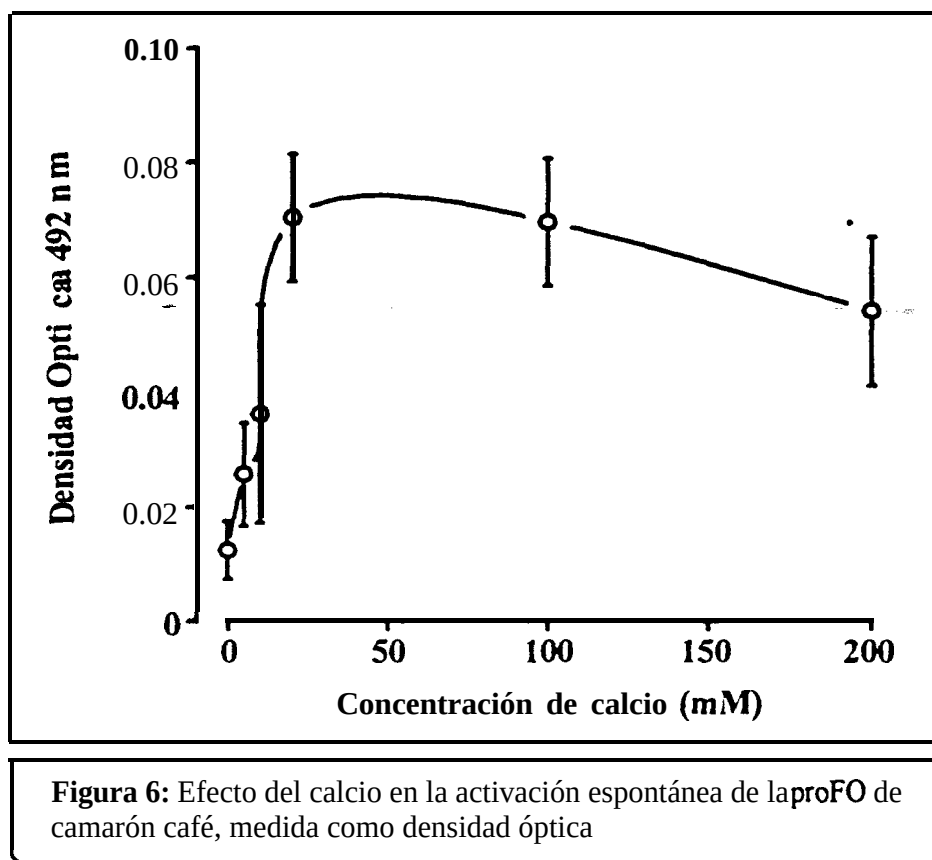


Tabla 8: Activación de **proFO** obtenida en **cacodilatos** con 5 mM de calcio, por **centrifugación**, a partir de **hemocitos** de camarón café.

Activador	Centrifugación (Actividad específica)
Control	0.127 ± 0.037
Químicos	
1. Etanol	0.087 ± 0.047
2. SDS	0.223 ± 0.022*
3. urea	0.128 ± 0.043
Enzimas	
1. Papaina	0.432 ± 0.075*
2. Quimotripsina	0.461 ± 0.099*
3. Tripsina	0.482 ± 0.114"
Sacáridos microbianos	
1. Laminarina	0.216 ± 0.039"
2. LPS (<i>E. coli</i>)	0.156 ± 0.041
3. LPS (<i>P. aeruginosa</i>)	0.130 ± 0.032
4. LPS (<i>S. marcescens</i>)	0.136 ± 0.020

*Activación significativa ($P < 0.05$) respecto al control, definida por ANOVA. Los resultados expresan la media de cuatro réplicas ± desviación patrón.

La activación de la **proFO** por una **via** proteolítica fue demostrada cuando se realizó un ensayo de **inhibición**, utilizando un inhibidor de tripsina (Soybean **Trypsin** Inhibitor, **STI**), logrando inhibir el 100 % de la activación por tripsina. Sin embargo, el **STI** no fue capaz de inhibir la activación inducida por SDS sugiriendo que el mecanismo de activación de este detergente es diferente a la proteólisis. El tratamiento con SDS-tripsina no **fué** significativamente mayor que el obtenido por cada uno de ellos individualmente (Figura 7).

En otro ensayo, se probó la activación de la **proFO** en muestras obtenidas por **centrifugación** y en SLH, utilizando LPS de 7 bacterias diferentes (*E. coli*, *V. cholerae*,

K. pneumoniae, *P. aeruginosa*, *Shigella marcescens*, *S. flexnerii* y *S. thyposa*). La muestra se incubó a diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120 min) y se probaron distintas concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 µg/mL). Sin embargo, en ningún caso se observó activación de la **proFO**.

Activación de hemocitos completos

Los experimentos hechos hasta el momento, corresponden a activación de la **proFO** en **muestras** obtenidas por centrifugación o por lisis de los hemocitos y cuantificando su transformación en FO. Sin embargo, **in vivo**, la activación del sistema **proFO** involucra la estimulación de los hemocitos, la liberación del contenido granular, su posterior transformación

Tabla 9. Activación de hemocitos y proFO libre de células, obtenida de camarón café.

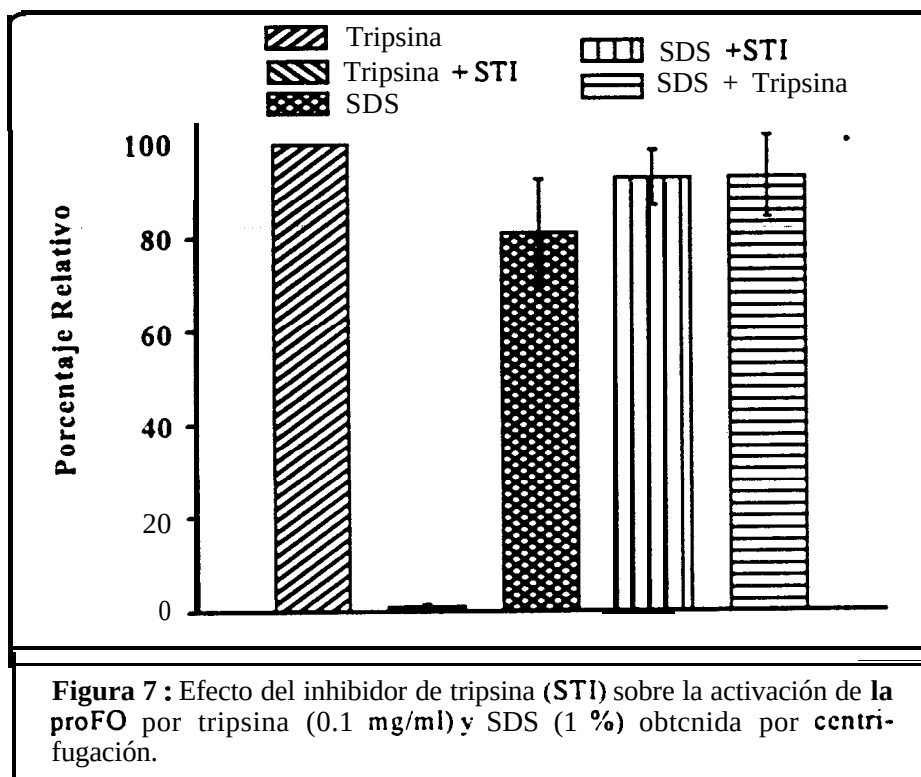
	Calcio (20 mM)	Laminarina + 20 mM de calcio	Laminarina sin calcio
Hemocitos	0.191 ± 0.006 (0.8)	0.622 ± 0.076 (2.7)	0.230 ± 0.023 (1)
Centrifugado	0.119 ± 0.007 (1.3)	0.159 ± 0.003 (1.7)	0.091 ± 0.013 (1)

Los valores representan el promedio de densidad óptica de 3 determinaciones ± desviación patrón. Los valores entre parentesis representan la magnitud de activación.

a FO y la estimulación de otras actividades celulares.

Con el fin de observar la activación de los hemocitos del camarón café, el papel fisiológico de esta activación y la importancia de este sistema enzimático como mecanismo de defensa, se probó la esti-

mulación por β -glucanos (laminarina), LPS de diferentes bacterias (*E. coli*, *V. choierae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *S. thyposa* y *S. jlexnerii*), bacterias (*Vibrio. parahaemolyticus* y *V. harveyi*) y levaduras (*Debaryomyces hansenni* y *Rhodotorula rubra*) marinas.



De la misma manera que lo observado cuando se probó el estímulo de la **proFO** libre, los LPS no **fueron** capaces de estimular los hemocitos de camarón café. Sin embargo, las bacterias y levaduras marinas lograron una activación significativa (Figura 8), lo que sugirió la participación de la membrana celular del **hemocito** en el proceso de activación. Como puede observarse en la Figura 8, aunque las bacterias generaron estímulos con intensidades variables, todas produjeron un estímulo significativamente mayor ($p < 0.01$) que las logradas con levaduras.

La activación por **laminarina**, en presencia o ausencia de calcio, se comparó **utilizando** hemocitos y muestras de **proFO** obtenidas por centrifugación. Tanto en los hemocitos como en el centrifugado, la activación por laminarina se encuentra

disminuida en ausencia de **calcio**, indican la participación de este catión durante **el** proceso. Por otro lado, mientras que el calcio es capaz de activar las muestras obtenidas por centrifugación (activación espontánea, este catión no tiene efecto directo en la **proFO** de los hemocitos (Tabla 9).

La participación del sistema **proFO** en la capacidad fagocítica de hemocitos ha sido demostrada en insectos (Leonard *et al.*, 1985a) y crustáceos (Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1986). Además, la capacidad de los hemocitos del camarón café, para fagocitar eritrocitos de ratón tratados con **glutaraldehído**, ha sido demostrada (Vargas-Albores, 1992). Por ello, se probó la influencia del sistema **proFO** activado en la promoción de la fagocitosis. La activación del sistema se hizo

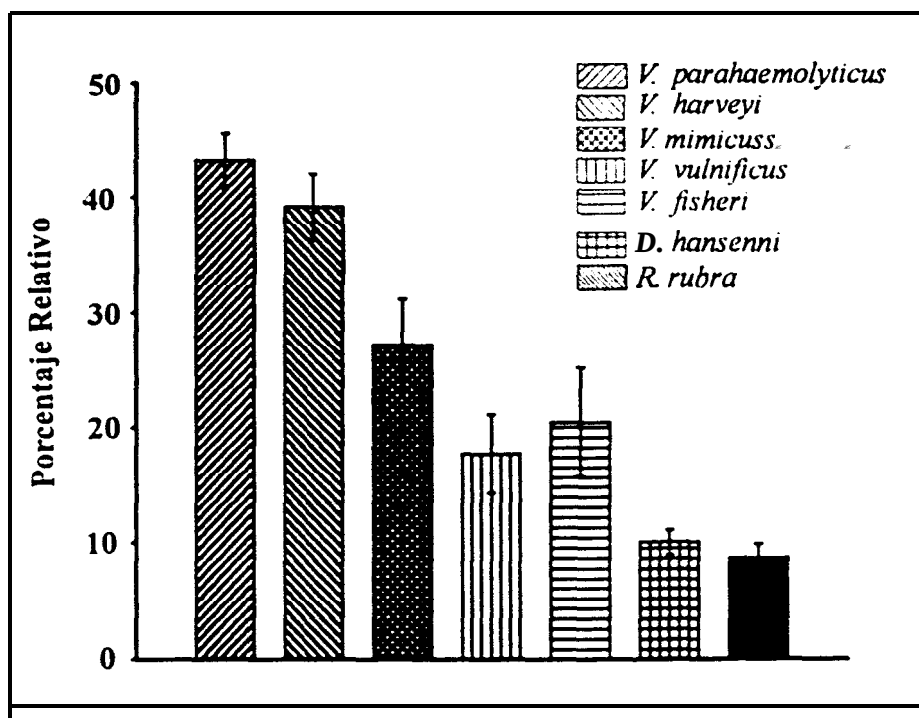
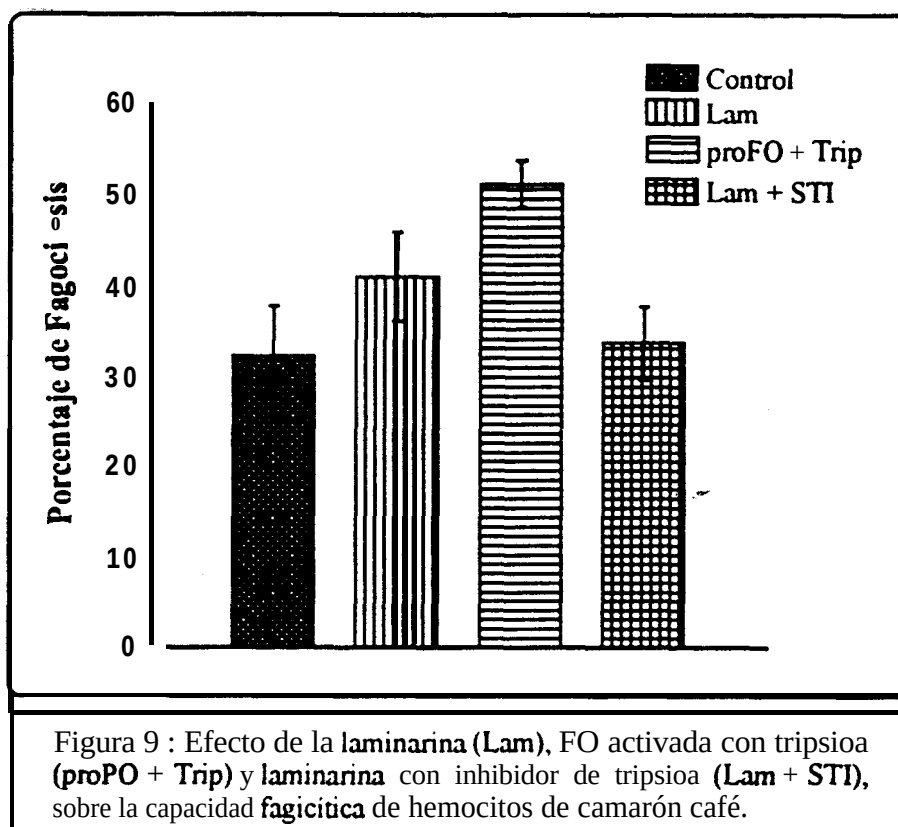


Figura 8: Activación de hemocitos completos con bacterias y levaduras marinas.



estimulando los hemocitos con laminarina (1 mg/mL) o adicionando contenido granular obteniendo por centrifugación y activado con tripsina. Como se puede apreciar en la Figura 9, en ambos casos se logró incrementar la capacidad fagocítica de los hemocitos de camarón café. Sin embargo, el estímulo generado por la FO activada por tripsina **fué** significativamente mayor que el logrado con FO activada por laminarina.

Por otro lado, cuando se adicionó al sistema una mezcla (v/v) de laminarina + STI, no se observó estímulo en la fagoci-

tosis, sugiriendo que en la activación por laminarina participa la enzima activadora de la **profenoloxidas**a, la cual pudo ser inhibida por el STI, **evitándose** la activación de la **proFO**.

Estos resultados manifiestan la relación que existe entre el sistema **proFO** y las actividades de defensa celular y sugieren la posible existencia de mecanismos de control *in vivo*, cuya acción sea bloquear la activación de la **proFO** por inhibición de la enzima activadora.

Discusión

El sistema **proFO** es un sistema **multienzimático** que se encuentra **compartamentado** en los gránulos citoplásmicos de los hemocitos granulares y **semigranulares**. (Söderhäll y Smith, 1983; Ratcliffe *et al.*, 1985; Leonard *et al.*, 1985a; Johansson y Söderhäll, 1989) Además de generar melanina y sus quinonas aromáticas intermediarias con actividad **fungistática** y bactericida (Söderhäll y Ajaxon, 1982; Rowley *et al.*, 1990) como producto de la enzima FO, el sistema **proFO** participa en la eliminación de material extraño a través de algunas reacciones celulares de defensa (Ratcliffe *et al.*, 1985; Söderhäll *et al.*, 1984; 1994; Leonard *et al.*, 1985a; Tömqvist *et al.*, 1994), por lo que se considera parte importante del sistema de defensa en estos organismos.

Para la detección de la actividad FO se utiliza L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) como sustrato, el cual es oxidado por la enzima FO, generando un compuesto de color café que presenta un máximo de **absorbancia** a 492 nm (Leonard *et al.*, 1985b). Sin embargo, con esta técnica no es posible determinar el contenido de **proFO**, debido a que la enzima se encuentra inactiva. Para poder hacerlo, es necesario incubar la muestra con tripsina (0.1 mg/mL) lo que garantiza la conversión de la enzima a su forma activa. Por otra parte, en busca de una metodología para pequeños volúmenes, se implementó la técnica en microplacas de 96 pozos la

cual ha sido usada en algunos trabajos de activación de **proFO** en invertebrados (Lockey y Ourth, 1992; Roch *et al.*, 1992). Con esta modificación, se obtuvo una adecuada correlación ($r = 0.99$) y precisión (CV <10%), por lo cual fue adoptada y empleada en varios experimentos. Dentro de las ventajas que presenta el trabajar con microplacas están: el menor gasto de reactivos y la manipulación de mayor número de muestras en forma **simultánea**.

El primer paso para la obtención del sistema **proFO** a partir de hemocitos de camarón café **fue** la separación del plasma por centrifugación. Inicialmente se siguió la técnica utilizada por Vargas-Albores (1992), centrifugando la hemolinfa en una centrífuga Eppendorf donde se genera una velocidad elevada (15,900 g) en comparación con las utilizadas (700-800 g) en la separación de los hemocitos de otros crustáceos (Ashida y Söderhäll, 1984; Kopáček *et al.*, 1993). Aunque en el plasma del camarón café no se encontraron evidencias de actividad FO o ésta **fue** muy baja (Vargas-Albores, 1992). cuando se midió la presencia de **proFO**, se detectaron valores significativamente altos, sugiriendo que la enzima en forma inactiva era liberada durante el proceso de obtención de los hemocitos o se encontraba normalmente en el plasma.

Aunque en insectos el sistema **proFO** ha sido detectado tanto en el plasma como en los hemocitos (Pye, 1974; Ashida, 1981; Ratcliffe *et al.*, 1984; Sugumaran *et al.*, 1985), no existe evidencia de su presencia en el plasma de crustáceos y aparentemente está **confinado** solamente en el interior de los hemocitos (Johansson y Söderhäll, 1985; Söderhäll *et al.*, 1986; Vargas-Albores, 1992). Sin embargo, todos estos trabajos solamente hacen referencia a la determinación de FO, es decir a la enzima activada, pero en ningún caso se buscó la presencia de la enzima en su forma inactiva (**proFO**). Por ello, se consideró necesario buscar la(s) causa(s) de estas observaciones.

El anticoagulante es la primera solución que se pone en contacto con la hemolinfa al ser extraída. Sin embargo, el anticoagulante usado en el presente trabajo (**SIC-EDTA**) se descartó como posible promotor de la liberación de **proFO** en el plasma de camarón café, debido a que mantiene las características **iónicas** y osmóticas de la hemolinfa de los camarones (Vargas-Albores y Ochoa, 1992). Además su **eficiencia** ha sido demostrada (Vargas-Albores *et al.*, 1993a) al no producir alteraciones **bioquímicas** y celulares en la muestra. Otra solución anticoagulante para la obtención de hemolinfa de crustáceos ha sido reportada (Söderhäll y Smith, 1983), la cual tiene un pH **ácido** (4.6). Sin embargo para la obtención de hemolinfa de camarón, esta solución promueven la precipitación de algunas proteínas de la hemolinfa, lo que limitó su utilización (Vargas-Albores *et al.*, 1993a).

Los anticoagulantes **comunmente** usados en los trabajos sobre activación del sistema **proFO**, contienen **azúcares** (Duvic y Söderhäll, 1993; Brookman *et al.*, 1989; Ratcliffe *et al.*, 1991). Ashida (1981)

logró obtener un sistema **proFO** estable en un SLH de hemocitos de *Bombyx mori*, mediante la inyección de un factor de la caña de **azúcar**. Debido a que los hemocitos de crustáceos son muy sensibles a bajas concentraciones de **β -glucanos** (Smith y Söderhäll, 1983b) o LPS (Söderhäll y Häll, 1984; Johansson y Söderhäll, 1985), los azúcares **así** como **el** factor de la caña de **azúcar** pueden causar degranulación y liberación del sistema **proFO** en el plasma. Sin embargo, para la extracción de la hemolinfa de camarón café, se **usó** **un** anticoagulante que contenía solamente sales y se tomaron todas las medidas preventivas para evitar la activación celular (agua libre de pirógenos, plástico y vidrio libres de endotoxinas o reactivos con calidad para cultivo de tejidos. etc.).

Otro factor que se investigó **fué** el calibre de la aguja empleada en la obtención de la hemolinfa. La mayoría de los trabajos sobre el sistema **proFO** en crustáceos se han realizado con especies de tallas mayores a las del **camarón** (langostas y langostinos), por lo que la extracción de hemolinfa se realiza con relativa facilidad empleando agujas de calibre 22. **Al** investigar el posible efecto del calibre de la aguja sobre la liberación de la **proFO** al plasma no se encontró diferencias por el uso de agujas con calibre 21, 22 y 25. La extracción de hemolinfa con agujas de calibre 20, provocó una liberación significativamente mayor ($p < 0.05$) de **proFO** al plasma, la cual puede ser consecuencia del daño tisular que éste tamaño de aguja produce.

Al no encontrar una importante influencia por el calibre de la aguja se evaluó el efecto de la centrifugación sobre la liberación de la **proFO** durante la separación de los hemocitos. La fuerza de **centrifuga-**

gación (15.900 g) alcanzada en una microcentrífuga aparentemente es la principal responsable de la liberación de **proFO** ya que utilizando otras **fuerzas** de centrifugación (400-800 g), es posible evitar esta liberación. Un hallazgo importante es haber detectado que la **proFO** es liberada en su forma inactiva, pudiendo separar, **al** menos, dos fenómenos involucrados en la activación del sistema **proFO**: la liberación y la activación. Por otro lado, comprobada por microscopia, la integridad de los hemocitos no es afectada por la liberación de pequeñas cantidades de **proFO** inducida por la **centrifugación** a 800 g. Las células son capaces de responder a un estímulo posterior y mantienen sus actividades de adhesión al vidrio o plásticos, liberación del sistema **proFO** y fagocitosis, como se discute mas adelante. Por ello, durante la separación de los hemocitos del camarón café, las fuerzas de centrifugación de 600 a 800 g pueden ser utilizadas. A pesar de que en ningún trabajo sobre el sistema **proFO** de insectos o de crustáceos se ha discutido la influencia de la velocidad de centrifugación sobre la liberación del sistema **proFO** al plasma, en la mayoría de ellos se usan velocidades cercanas a 800 g (Leonard *et al.*, 1985a; Ratcliffe *et al.*, 1991; Kopáček *et al.*, 1993).

Otro factor que podría estar influenciando la liberación de componentes del sistema **proFO** durante la separación de los hemocitos es la salinidad. Vargas-Albores y Ochoa (1992), determinaron las concentraciones de sodio y potasio, el pH y la osmolalidad de la hemolinfa de camarón azul; propiedades similares a las del camarón café (Vargas-Albores *et al.*, 1991; Vargas-Albores, 1992). Esto permitió diseñar una solución anticoagulante para la extracción de hemolinfa de camarón

café (Vargas-Albores *et al.*, 1993a), la cual también es isoosmótica con la hemolinfa del camarón azul (Vargas-Albores y Ochoa, 1992) y del camarón blanco (Vargas-Albores, comunicación personal). Debido a que, en forma natural, los hemocitos se encuentran en un ambiente con altas concentraciones de sodio (450 mM), es lógico suponer que **concentraciones** salinas menores pueden generar condiciones desfavorables de **osmolalidad** que aumenten la sensibilidad de las células **y/o** afecten algunas actividades **celulares**.

Cuando los hemocitos fueron **centrifugados** en un amortiguador de cacodilatos sin **NaCl**, se liberó aproximadamente 10 veces más cantidad de **proFO** que cuando se usaron 450 mM de **NaCl**. Esta liberación es favorecida si se incrementa la velocidad de centrifugación (Tabla 6). Sin embargo, cuando se combinan ambos parámetros, la salinidad más que la fuerza de centrifugación, tiene el efecto más importante sobre la liberación de la **proFO**. Con estos resultados se **implementó** un método para obtener preparaciones con alto contenido de **proFO**. Los hemocitos son separados de la **hemolinfa** por centrifugación a 800 g, **resuspendidos** en amortiguador de baja salinidad y centrifugados a 15,000 g, obteniéndose en el sobrenadante una muestra que contiene **proFO**.

Otros iones también tienen influencia en el sistema **proFO**. Por ejemplo, se ha demostrado que en insectos y crustáceos, el calcio es importante para la estabilidad de la **proFO** (Leonard *et al.*, 1985b; Johansson y Söderhäll, 1988). El uso de otras concentraciones de calcio (100-200 mM), evita la estimulación **espontánea** de la enzima **proFO** (Ashida *et al.*, 1983; Ashida y Söderhäll, 1984; Söderhäll

y Hall, 1984; Leonard *et al.*, 1985a; Kobayashi *et al.*, 1990). En algunos insectos (Dularay y Lackie, 1985) y crustáceos (Ashida y Söderhäll, 1984), se observó que la ausencia de calcio permite obtener un sistema **proFO** estable. Así, la participación de calcio en la estabilidad de la **proFO** parece ser **controversial**. Los resultados obtenidos con camarón muestran que la ausencia de calcio evita la activación espontánea de la **proFO** y que se requieren bajas concentraciones (5 mM) para provocar su activación espontánea (Figura 6), pero que un aumento en la concentración (mayor o igual a 200 mM) no evita la activación

Los iones magnesio y manganeso pueden producir activación espontánea de la **proFO** de hemocitos de camarón café, durante la extracción por **centrifugación**. Aunque el mecanismo de acción de los cationes en la activación de la **proFO** no ha sido dilucidado, se han planteado algunas hipótesis.

Roch *et al.* (1992), trabajando con un equinodermo (*Halotorula tubulosa*), obtiene evidencias para sugerir un modelo de transformación de **proFO** a FO. Ellos proponen que la **proFO** es convertida por una **serin-proteinasa** en un intermediario de 14.5 kDa que a su vez, es polimerizado a un tetrámero de 60 kDa requiriendo calcio para su formación. Sin embargo, los mismos autores obtienen, aunque en menor grado, activación de la **proFO** por tripsina en ausencia de calcio. Este modelo es dudoso o al menos no es aplicable en el camarón café donde es posible activar con tripsina independientemente de la presencia o ausencia de calcio (Tabla 7).

En insectos (Ashida y Yamazaki, 1990) y crustáceos (Söderhäll y Hall, 1984;

Kobayashi *et al.*, 1990). parece ser que el calcio participa como promotor mediante la activación de la **EApFO** ya que la adición de calcio aumenta la actividad de proteasas en SLH. En el camarón café aparentemente el calcio activa a nivel de la enzima activadora de la **proFO**. Esto se concluye al observar que la activación por calcio, de **proFO obtenida** por centrifugación de hemocitos, puede ser inhibida por **melitina** o por **STI** (Gollas-Galván, 1995). Ambos compuestos son inhibidores de proteasas.

Por otro lado, la presencia de calcio no tubo efecto en la liberación y activación del sistema **proFO** de una suspensión de hemocitos de camarón café (Tabla 9). La combinación de estos resultados nos permite proponer que el sistema **proFO** debe encontrarse fuera del **hemocito** para ser susceptible de activación por calcio. Considerando el hecho de que la concentración de calcio en el plasma de camarón **café** es de aproximadamente 8.5 mM, es posible que *in vivo* los componentes del sistema **proFO** sean liberados en respuesta a un estímulo y, posteriormente, la **proFO** sea activada a través de reacciones **proteolíticas** que involucran el calcio **extracelular**.

Combinando las observaciones que demuestran que la baja salinidad favorece la liberación del sistema **proFO** y el hecho de que en ausencia de calcio, el sistema **proFO** es estable, se implementó una nueva metodología que consiste en la **resuspensión** de los hemocitos en amortiguador de cacodilatos sin NaCl y sin calcio, seguido de centrifugación a alta velocidad (15,900 g). De esta forma se lograron obtener preparaciones de **proFO** estable de manera fácil y rápida, con la probable ventaja de recuperar la enzima con bajo porcentaje de proteínas **contami-**

nantes (no relacionadas con el sistema **proFO**), condición que no puede ser alcanzada en las preparaciones de SLH.

Debido a que el sistema **proFO** puede reconocer moléculas relacionadas con microorganismos, **tales** como **β -glucanos**, peptidoglucanos y LPS, es fácil proponer que este sistema involucra a componentes capaces de reconocer a microorganismos invasores.

Sin embargo, en el camarón café ninguno de los LPS probados (*E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *K. pneumoniae*, *S. thyposa* y *S. flexnerii*), lograron producir activación de la **proFO**. La activación del sistema **proFO** por LPS, no siempre ha sido posible, tanto en insectos, como en crustáceos. En algunos casos, la activación es **facilmente** demostrada (Johansson y Söderhäll, 1988; Bréhelin *et al.*, 1989; Smith y Söderhäll, 1991), mientras en otros este fenómeno no ha podido ser reproducido (Smith y Söderhäll, 1991; Ashida y Yamazaky, 1990). Pese a esta variabilidad, en todos los casos, el sistema **proFO** ha podido ser activado por células bacterianas completas.

En el camarón café, ni las bacterias ni las levaduras marinas probadas lograron activar muestras de **proFO** obtenidas por centrifugación o lisis de las células. Sin embargo, *estos* microorganismos *fueron* capaces de estimular a una suspensión de hemocitos. lo que sugiere la necesidad de otros componentes. como la membrana celular para que el estímulo por microorganismos sea generado.

En los **ultimos** años se ha investigado la participación de **algunos** componentes humorales en la activación del sistema **proFO**. Recientemente se aisló del cama-

rón **café** una aglutinina sérica capaz de reaccionar con LPS (Vargas-Albores *et al.*, 1993b). Sin embargo, esta proteína no parece participar en la activación del sistema **proFO**, aunque es capaz de estimular la actividad fagocítica (Vargas-Albores, 1995).

Por su parte, la activación por laminarina **fue** demostrada en el camarón café, tanto en extracciones celulares (SLH o centrifugado) como en hemocitos completos. De la misma forma que en algunos insectos (Leonard *et al.*, 1985b; Saul y Sugumaran, 1988; Bréhelin *et al.*, 1989) y crustáceos (Smith y Söderhäll, 1983b; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1994). la activación de la **proFO** de camarón por **β -glucanos** **fue** dependiente de la concentración, hasta 1 mg/mL. A partir de esta concentración, la pendiente tiende a cero y no es posible incrementar el estímulo por dosis mayores de 5 mg/mL.

En relación a la participación de componentes humorales en la reacción, se ha descrito una proteína sérica llamada "Beta-glucan binding protein" (BGBP). Esta proteína ha sido detectada en el camarón café (Jiménez-Vega y Vargas-Albores, 1994) y recientemente se ha logrado su purificación y caracterización (Vargas-Albores *et al.*, 1995). La BGBP de camarón café es una proteína **monomérica** con masa molecular de 100 kDa, muy similar en su contenido de aminoácidos y secuencia N-terminal a la BGBP del langostino (*P. leniusculus*) (Vargas-Albores *et al.*, 1995). Debido a su capacidad de reaccionar con **β -1,3-glucanos**, constituyentes de la pared celular de los hongos, levaduras y algas, y con la membrana de los hemocitos (Duvic y Söderhäll, 1992; 1993). esta proteína ha sido propuesta como una molécula de reconocimiento (Vargas-Albores, 1995).

De igual forma que para algunos insectos (Ratcliffe *et al.*, 1985; Bréhelin *et al.*, 1989) y crustáceos (Ashida y Söderhäll, 1984), la proFO de camarón café también pudo ser activada por algunos compuestos químicos (etanol y SDS). Sin embargo, el mecanismo de activación por estos compuestos parece ser diferente al proteolítico ya que no pudo ser bloqueada por STI. Aunque aún no se tiene claro el mecanismo de acción de estos compuestos, Preston y Taylor (1970) propusieron tres hipótesis para explicar la acción de los solventes orgánicos sobre la proFO: a) eliminación de inhibidores, b) producción de cambios químicos en la molécula, exponiendo el sitio activo, c) agregación de subunidades las cuales forman la enzima activa. Sin embargo, Ashida y Yoshida (1988) sugirieron que la agregación de moléculas de FO puede ser una consecuencia más que la causa de activación.

Se ha demostrado que el sistema proFO de invertebrados tiene una participación importante en los procesos de fagocitosis (Smith y Söderhäll, 1983a; Söderhäll, 1992; Söderhäll *et al.*, 1986). En el camarón café, Vargas-Albores (1992) realizó algunos estudios sobre la capacidad fagocítica de los hemocitos, demostrando además que la fagocitosis puede ser estimulada por la aglutinina sérica (Vargas-Albores, 1992; 1995). Sin embargo, no se ha demostrado que este fenómeno este relacionado con el sistema proFO.

En este trabajo, se demostró que la FO es capaz de aumentar la capacidad fagocítica de los hemocitos de camarón café (Figura 9). Este fenómeno se observó tanto con la FO, obtenida por centrifugación y activada por tripsina, como con la FO

liberada por consecuencia de la estimulación de los hemocitos con β -glucanos. Considerando que se requiere FO para la estimulación de la fagocitosis, es probable que la mayor actividad fagocítica observada cuando se utilizó FO activada con tripsina se deba a que la enzima se encuentra rápidamente disponible. Por otro lado, la inhibición del efecto promotor de fagocitosis vía β -glucanos, producida por el STI, sugiere la necesaria intervención de la enzima activadora de la proFO en el proceso de activación. *In vitro*, cuando el STI bloquea la enzima activadora, la proFO, aunque pueda ser liberada, no es convertida en FO. *In vivo*, se ha propuesto, como mecanismo de control, una inactivación de la EApFO por factores séricos (Sugumaran *et al.*, 1985; Donovan y Laue, 1991) del tipo $\alpha 2$ macroglobulina ($\alpha 2$ MG) y/o antitripsina. La presencia de $\alpha 2$ MG se ha descrito en algunos, crustáceos incluyendo: *Limulus polyphemus* (Armstrong *et al.*, 1991), *Astacus astacus* (Stöcker *et al.*, 1991), *Homarus americanus* (Spycher *et al.*, 1987) y *Pacifastacus leniusculus* (Hergenhahn *et al.*, 1988), sin embargo nada se conoce de este tipo de proteínas en los camarones.

Aunque el mecanismo aun no se ha explicado, en el langostino y cangrejo se ha detectado aumento en la capacidad fagocítica de los hemocitos en presencia de β -glucanos (Smith y Söderhäll, 1983b). Por otro lado, Söderhäll *et al.* (1986), trabajando con *Pacifastacus leniusculus* y *Carcinus maenas*, sugieren que los LPS y los β -glucanos estimulan las células granulares para que liberen la proFO. Posteriormente, esta proFO es activada y se adhiere a los microorganismos (*Moraxella* sp), aumentando la posibilidad de ser fagocitados (opsonización).

A pesar de los conocimientos que hasta la fecha se tienen sobre los mecanismos de defensa de los crustáceos, aun queda mucho por comprender sobre el papel del sistema **proFO** y su relación con otros

mecanismos de defensa, para lograr su utilización como herramienta de **diagnóstico** y prevención en las enfermedades de los camarones en cultivo.

Conclusiones

La importancia del estudio de la inmunidad de los invertebrados radica en puntos diversos, que van desde el interés comercial hasta el científico. En lo comercial, porque un debilitamiento de los sistemas de defensa en organismos perjudiciales podría ser empleado como control de plagas. Por lo contrario, la posibilidad de **potencializar** estos mecanismos de defensa, podrían ser utilizados en organismos cultivables, para evitar enfermedades. El interés **científico** se basa en la posibilidad de encontrar eventos inmunológicos no detectados en los organismos superiores, **así** como definir los mecanismos por los cuales, organismos considerados inferiores pueden hacer frente a las agresiones biológicas de su entorno. Esto tiende a encontrar un concepto unificador de la respuesta inmune, una forma que permita generalizar la conducta de un sistema, tan diverso en forma y con un solo objetivo: conservar la integridad biológica.

En este trabajo se abordó el estudio del sistema **proFO** de los hemocitos del camarón, uno de los sistemas mas complejos que participan en los mecanismos de defensa de los crustáceos. Se probaron sus formas de activación y su **participación** en funciones de eliminación de material extraño como la fagocitosis.

De acuerdo con los resultados el sistema **proFO** se encuentra en el interior de los hemocitos del camarón café y puede ser

extraído por lisis o por centrifugación. Aunque en condiciones diferentes, estas preparaciones pueden ser activadas de manera similar a otros crustáceos. La importancia de **este** sistema en el reconocimiento y eliminación de patógenos, se refleja en la estimulación de los hemocitos del camarón café por **β -glucanos**, bacterias y levaduras marinas, para liberar el sistema **proFO**. Una vez activado, el sistema es capaz de estimular fagocitosis.

En los estudios del sistema **proFO**, uno de los principales problemas es la activación **espontánea** que se genera durante **el** proceso de obtención de las muestras. Sin duda, una contribución importante de este trabajo **fue** la **implementación** de una metodología simple y rápida que permite la obtención de preparaciones que contienen todos los elementos del sistema **proFO**, además, de logra la recuperación de la enzima **proFO** estable.

El calcio parece tener un papel importante en el proceso de activación del sistema **proFO** del camarón a través de la activación de la **EApFO**. Esto permite proponer un modelo de activación *in vivo*, donde los componentes del sistema **proFO** probablemente son liberados en forma inactiva y, posteriormente, al contacto con el calcio plasmático (8.5 mM), se inicia la activación.

La liberación y activación del sistema **proFO** de los camarones, no es la línea terminal de este mecanismo de defensa. Una vez activada extracelularmente, la FO incrementa la actividad fagocítica y fortalece el sistema de defensa. Al

estimular otras actividades celulares, la respuesta se magnifica y contribuye a la eliminación del parásito.

Anexo

Reactivos

Agua destilada libre de pirógenos: Se esterilizó agua destilada, en autoclave a 121 °C por 15 min. y se pasó a través de un filtro con poro de 0.45 µ. Los pirógenos fueron eliminados de esta agua, mediante una columna de Detoxi-gel (Pierce, 20344). Todos los reactivos fueron preparados con esta agua

Agua de mar artificial: $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.52 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13 g, KCl 0.78 g, NaCl 36.94 g. Adicionar las sales en 500 mL de agua destilada. en el orden descrito, permitiendo la disolución completa de cada una antes de adicionar la siguiente. Aforar a 1 litro con agua destilada y esterilizar en autoclave (121 °C durante 15 min). Dejar reposar por lo menos 48 horas antes de usarse (MacLeod, 1968).

Caldo marino 2216: Se pesan 37.4 g de caldo marino 2216 (obtenido comercialmente de DIFCO) y se disuelve en 1 litro de agua destilada, se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Caldo M1 para levaduras: Glucosa 20 g, Peptona 10 g. extracto de levadura 5 g. Aforar a 1 litro con agua de mar artificial. Ajustar a pH 4.5 con HCl 0.1 N.

E-Toxa-Clean: (Sigma Chem. Co.): Solución acuosa al 1%.

Reactivo de Folin y Ciocalteu: Solución 2N obtenida de Sigma Chem. Co., (F-9252).

Preparación de material libre de pirógenos

Material de vidrio: Se lavó perfectamente con agua y jabón y se colocó en una estufa a 180°C durante 4 horas.

Material de plástico: Se lavó abundantemente con agua y jabón y se trató, por inmersión en E-toxa-clean, durante 30 min. Posteriormente, se enjuagó con agua libre de pirógenos y se secó en estufa a 37°C.

Soluciones

Anticoagulante (SIC-EDTA): Se utilizó la solución anticoagulante descrita para camarón por Vargas-Albores et al., (1993a): NaCl 450 mM, KCl 10 mM, HEPES 10 mM y EDTA-Na 10 mM disueltas en agua libre de pirógenos y se ajustó el pH a 7.3. Esta solución se esterilizó por filtración en membrana con poro de 0.22 µ de diámetro y se almacenó a 4°C.

Amortiguador de cacodilatos (Cac): El amortiguador de cacodilatos fue preparado en agua libre de pirógenos, conteniendo:

10 mM de cacodilato de sodio y 10 mM de cloruro de calcio; pH=7.0.

Sustrato (L-DOPA): El sustrato utilizado fue una solución acuosa de 3 mg/mL (15 mM) de L-3,4-dihidroxifenil-alanina (Sigma Chem. Co., D-9628). Esta solución debe ser preparada momentos antes de usarse porque es sensible a la luz.

Glutaraldehído-NaCl 0.15 M: 1 mL de glutaraldehído 25% (Sigma Chem. Co.), en 9 mL de solución salina 450 mM.

NaCl 450 mM: Pesar 2.630 g de NaCl y disolver en 100 mL de agua libre de pirógenos.

Reactivo Alcalino: Solución acuosa de tartrato de sodio y potasio 2 % (A), solución acuosa de sulfato de cobre 1 % (B), carbonato de sodio 2 % disuelto en NaOH 0.1 N (C). La solución de trabajo se preparó adicionando 100 µL de A y 100 µL de B, en 10 mL de C.

Laminarina: Para la activación, se usó laminarina (B, 1-3 glucano, obtenida comercialmente (Sigma Chem. Co., L-9634) a una concentración de 1 mg/mL,

preparada en agua, la cual es obtenida de una alga llamada *Laminaria digitata*.

Activadores Químicos: Los reactivos usados se disolvieron en agua a concentraciones de: urea 2 M, SDS 1 % y etanol absoluto.

Enzimas

Enzimas proteolíticas: Para los ensayos de activación enzimática, se usó tripsina (EC 3.4.2 1.4) tipo XI de pancreas de bovino (Sigma Chem Co.) a una concentración de 0.1 mg/mL. En algunas pruebas, se emplearon otras enzimas proteolíticas: quimotripsina de bovino (EC 3.4.21.1) y papaína (EC 3.4.22.2) a concentración de 0.1 mg/mL. Todas las preparaciones enzimáticas se prepararon en agua.

Tripsina-STI: Se pesaron 2 mg del inhibidor de tripsina: Soybean trypsin inhibitor (STI, Sigma Chem. Co.) y se disolvieron en 10 mL de solución acuosa conteniendo tripsina 0.1 mg/mL.

Bibliografía

- Adams, A. (1991) Response of penaeid shrimp to exposure to *Vibrio* species. Fish Shellfish Immunol. 1: 59-70.
- Armstrong, P., Mangel, W., Wall, J., Hainfield, J., Vanholde, K., Ikai, A., Qu, X. (1991) Structure of $\alpha 2$ macroglobulin from the arthropod *Limulus polyphemus*. J. Biol. Chem. 266: 2526-2530.
- Ashida, M. (1981) A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 11: 57-65.
- Ashida, M., Söderhäll, K. (1984) The prophenoloxidase activating system in crayfish. Comp. Biochem. Physiol. 77B: 21-26.
- Ashida, M., Yoshida, H. (1988) Limited proteolysis of prophenoloxidase during activation by microbial products in insect plasma and effect of phenoloxidase on electrophoretic mobilities of plasma proteins. Insect Biochem. 18: 11-19.
- Ashida, M., Yamazaki, H. (1990) Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: With special reference to its activation. In: Ohnishi, E. and Ishizaki, H. (eds.). Molting and Metamorphosis. Berlin: Springer-Verlag 239-265.
- Ashida, M., Ishizaki, Y., Iwahana, H. (1983) Activation of prophenoloxidase by bacterial cell wall or beta-1,3-glucan in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem. Biophys. Res. Com. 113: 562-568.
- Aspán, A., Sturtevant, J., Smith, V., Söderhäll, K. (1990) Purification and characterization of a prophenoloxidase activating enzyme from crayfish blood cells. Insect Biochem. 20: 709-718.
- Bach, J. (1984) Immunologia Ed. LIMUSA, México, D.F. pp. 11-21.
- Barraco, M., Duvic, B., Söderhäll, K. (1991) The β -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a β -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. Cell. Tissue Res. 266: 491-497.
- Bréhel, M., Drif, L., Baud, L., Boemare, N. (1989) Insect haemolymph: Cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. Insect Biochem. 19: 301-307.
- Brookman, J., Ratcliffe, N., Rowley, A. (1989) Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insect by bacterial cell wall components. Insect Biochem. 19: 47-57.
- Cenini, P. (1983) Comparative studies on haemagglutinins and haemolysins in an annelid and a primitive crustacean. Develop. Comp. Immunol. 7: 637-640.
- Cerenius, L., Henttonen, P., Lindqvist, O., Söderhäll, K. (1991) The crayfish pathogen *Psorospermium haeckeli* activates the prophenoloxidase activating system of freshwater crayfish *in vitro*. Aquaculture 99: 225-233.
- Chisholm, J., Smith, V. (1995) Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. 110A: 39-45.
- Coombe, D., Ey, P., Jenkin, C. (1984) Self/non-self recognition in invertebrates. Q. Rev. Biol. 59: 231-255.
- Donovan, M., Lauc, T. (1991) A Novel Trypsin Inhibitor from the Hemolymph of the Horseshoe Crab *Limulus polyphemus*. J. Biol. Chem. 266: 2121-2125.

- Dularay, B., Lackie, A. (1985) **Haemocytic encapsulation** and the **prophenoloxidase-activation pathway** in the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. *Insect Biochem.* 15: 827-834.
- Duvic, B., Söderhäll, K. (1990) Purification and characterization of a **β -1,3-glucan** binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 265: 9327-9332.
- Duvic, B., Söderhäll, K. (1992) Purification and **partial** characterization of a **β -1,3-Glucan-binding-protein** membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* Eur. *J. Biochem.* 207: 223-228.
- Duvic, B., Söderhäll, K. (1993) **β -1,3-glucan-binding proteins** from plasma of the freshwater crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *J. Crustacean Biol.* 13: 403-408.
- Evans, E., Painter, B., Evans, M., Weinheimer, P., Acton, R (1968) An induced bactericidin in the spin lobster *Panulirus argus* Pmc. *Soc. Exp. Biol. Med.* 128: 394-398.
- Evans, E., Weinheimer, P., Painter, B., Acton, R, Evans, M. (1969) **Secondary** and **tertiary** response of the induced bactericidin from the West Indian spin lobster *Panulirus argus*. *J. Bacteriol.* 98: 943-946.
- Gollas-Galván, T. (1995) Purificación y **caracterización** de la **profenoloxidas** de hemocitos de **camarón café** (*Penaeus californiensis*). Tesis de Maestría. CICIMAR, La Paz, B.C.S. En preparación
- Guzmán, M. A., Ochoa, J. L., Vargas-Albores, F. (1993) Haemolytic activity in the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) haemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 271-275.
- Hergenroth, H., Hall, M., Söderhäll, K. (1988) Purification and characterization of an **α 2-macroglobulin-like proteinase inhibitor** from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Biochem. J.* 255: 801-806.
- Hernández-Saavedra, N. Y. (1990) **Levaduras marinas aisladas en la costa occidental de Baja California sur, México.** Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hose, J., Martin G. (1989) **Defense Functions of Granulocytes in the Ridgeback Prawn** *Sicyonia ingentis*. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 335-346.
- Hose, J., Martin, G., Nguyen, V., Lucas, J., Rosenstein, T. (1987) **Cytochemical feature of shrimp hemocytes.** *Biol. Bull.* 173: 178-184.
- Hose, J., Martin, G., Gerard, A. (1990) A **decapod** hemocyte classification **scheme integrating morphology, cytochemistry, and function.** *Biol. Bull.* 178: 3345.
- Jketani, M., Morishima, I. (1993) Induction of **antibacterial** protein synthesis by soluble **peptidoglycan** in isolated fat body from larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec.* 23: 913-917.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T. (1992) Molecular **mechanism** of hemolymph clotting system in *limulus*. *Thrombos. Res.* 68: 1-32.
- Iwanaga, S., Muta, T., Shigenaga, T., Miura, Y., Seki, N., Saito, T., Kawabata, S. (1994) Role of hemocyte-derived **granular components** in invertebrate defense. In: Beck, G., Harboccht, G., Cooper, E., Marchalonis, J. (eds). **Primordial immunity : Foundations for the vertebrate immune system.** Ann. NY Acad. Sci. 712: 102-116.
- Jiménez-Vega, F., Vargas-Albores, F. (1994) **Aislamiento de una proteína sérica de camarón café** (*Penaeus californiensis*) que reacciona con beta-glucanos. XX Congreso Nacional de Bioquímica. Zacatecas, Zac., México. 186.
- Johnson, P. (1987) A **review of fixed phagocytotic cells of decapod crustaceans, with remarks on haemocytes.** *Develop. Comp. Immunol.* 11: 679-704.
- Johansson, M., Söderhäll, K. (1985) **Exocytosis** of the prophenoloxidase activating system from **crayfish haemocytes.** *J. Comp. Physiol.* 156B: 175-181.
- Johansson, M., Söderhäll, K. (1988) **Isolation and purification of a cell adhesion factor** from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106: 1795-1803.

- Johansson, M., Söderhäll, K. (1989) **Cellular immunity in crustaceans and the proPO system.** *Parasitol. Today*. 5: 171-176.
- Johansson, M., Söderhäll, K. (1992) **Cellular defense and cell adhesion in crustaceans.** *Anim. Biol.* 1: 97-107.
- Kobayashi, M., Johansson, M., Söderhäll, K. (1990) **The 76 kD cell-adhesion factor from crayfish haemocytes promotes encapsulation in vitro.** *Cell Tissue Res.* 260: 13-18.
- Kopáček, P., Grubhoffer, L., Söderhäll, K. (1993) **Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*.** *Develop. Comp. Immunol.* 17: 407-418.
- Lackie, A. (1980) **Invertebrate immunity.** *Parasitology* 80: 393-412.
- Leonard, C., Ratcliffe, N., Rowley, A. (1985a) **The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells.** *J. Insect Physiol.* 31: 789-799.
- Leonard, C., Söderhäll, K., Ratcliffe, N. (1985b) **Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes.** *Insect Biochem.* 15: 803-810.
- Lightner, D. (1983) **Diseases of cultured penaeid shrimp.** In CRC handbook of mariculture. Volumen I. *Crustacean Aquaculture*. CRC press. Inc. 289-319.
- Lightner, D. (1992) **Shrimp virus diseases: diagnosis, distribution and management.** In Wibian, J. (ed). *Proceedings of the special session on shrimp farming.* World Aquaculture Society. Baton Rouge, L. A., U.S.A. 238-253.
- Lockey, T., Ourth, D. (1992) **Isolation and characterization of hemolymph phenoloxidase from *Heliothis virescens* larvae.** *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 891-896.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. (1951) **Protein measurement with Folin phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MacLeod, R. (1968) **On the role of organic ions in the physiology of marine bacteria.** *Advances in Microbiology of the Sea*. 1: 95-126.
- Martin, G., Graves, B. (1985) **Fine structure and classification of shrimp haemocytes.** *J. Morphol.* 185: 339-318.
- Martin, G., Hose, J., Kim, J. (1987) **Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*: light and electron microscopic observations.** *J. Morphol.* 192: 193-204.
- McCumber, L., Clem, L. (1977) **Recognition of viruses and xenogenic proteins by the blue crabs *Callinectes sapidus* I: Clearance and organ concentration.** *Develop. Comp. Immunol.* 1: 5-14.
- McCumber, L., Hoffmann, E., Clem, L. (1979) **Recognition of viruses and xenogenic proteins by the blue crabs *Callinectes sapidus*: a humoral receptor for T2 bacteriophage.** *J. Invertebr. Pathol.* 33: 1-9.
- Morishima, I., Horiba, T., Yamano, Y. (1991) **Lysozyme activity in immunized and non-immunized hemolymph during the development of the silkworm *Bombyx mori*.** *Comp. Biochem. Physiol.* 108A: 311-314.
- Murali, S., Mullainadhan, P., Arumugam, M. (1994) **A lipopolysaccharide-binding hemagglutinin with specificity for acetylated aminosugars in the serum of the hermit crab *Diogenes affinis* (Henderson).** *J. Invertebr. Pathol.* 64: 221-227.
- Neal, R. (1973) **Alternatives in aquaculture development: consideration of extensive versus intensive methods.** *J. Fish. Res. Biol. Can.* 30: 2218-2238.
- Nylén, L., Unestam, T. (1980) **Wound reactions and *Aphanomyces astaci* growth in crayfish cuticle.** *J. Invertebr. Pathol.* 36: 187-197.
- Preston, W., Taylor, R. (1970) **Observations on the phenoloxidase system in the haemolymph of the cockroach *Leucophaea maderae*.** *J. Insect Physiol.* 16: 1729-1744.
- Pye, A. (1971) **Microbial activation of phenoloxidase from immune insect larvae.** *Nature* 151: 610.
- Ratanapo, S., Chulavatnatol, M. (1990) **Monodan, a new sialic acid-specific lectin from black tiger prawn (*Penaeus monodon*).** *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 515-520.

- Ratcliffe, N. (1985) Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. *Immunol. Lett.* 10: 253-270.
- Ratcliffe, N., Leonard C., Rowley, A. (198-t) **Prophenoloxidase** activation: Non-self **recognition and cell cooperation in insect immunity**. *Science* 226: 557-559.
- Ratcliffe, N., Rowley, F., Fitzgerald S., Rhodes, C. (1985) Invertebrate immunity: basic **concepts and recent advances**. *Int. Rev. Cytol.* 97: 183-350.
- Ratcliffe, N., Brookman, J., Rowley, A. (1991) Activation of the **prophenoloxidase cascade** and **initiation** of nodule formation in locusts by **bacterial** lipopolysaccharides. *Develop. Comp. Immunol.* 15: 33-39.
- Ratner, S., Vinson, S. (1983) Phagocytosis and encapsulation: **Cellular** immune response in arthropoda. *Amer. Zool.* 23: 185-194.
- Rowley, A., Rahmet-Alla, M. (1990) Prophe-noloxidase activation in the blood of *Leucophaea maderae* by microbial **product** and **different strains** of *Bacillus cereus*. *J. Insect Physiol.* 36: 93 1-937.
- Rowley, A., Brookman, J., Ratcliffe, N. (1990) Possible involvement of the **prophenoloxi-dase** system of the **locust** *Locusta migratoria* in **antimicrobial** activity. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 3 1-38.
- Roch, P., Lassegues, M., Valembois, P. (199 1) **Antibacterial activity** of *Eisenia fetida andrei* coelomic fluid: **III-relationship within** the polymorphic hemolysins. *Develop. Comp. Immunol.* 15: 27-32.
- Roch, P., Caniutti, C., Sammaroco, S. (1992) Tetrameric **structure** of the active **phenoloxi-dase** **evidenced in the coelomocytes** of the **echinoderm** *Holoturia tubulosa* *Comp. Bio-chem. Physiol.* 102B:349-355.
- Saul, S., Sugumaran, M. (1987) Protease mediated **prophenoloxidase** activation in the hemo-lymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archs Insect Biochem.* 5: 1-11.
- Saul, S., Sugumaran, M. (1988) Prophenoloxidase activation in the hemolymph of *Sarcophaga bullata* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 7: 91-103.
- Saul, S., Bin, L., Sugumaran, M. (1987) The **majority of prophenoloxidase in the hemo-lymph of Manduca sexta** is present in the plasma and not in the hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.* 11: 479-486.
- Shigenaga, T., Takayenoki, Y., Kawasaki, S., Seki, N., Muta, T., Toh, Y., Ito, A., Iwanaga, S. (1993) Separation of **large and small granules from horseshoe crab (Tachypleus tridentatus) hemocytes** and characterization of their **components**. *J. Biochem.* 114: 307-316.
- Smith, V., Söderhäll, K. (1983a) Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the **freshwater crayfish, Astacus astacus** by **com-ponents of the prophenoloxidase activating system in vitro**. *Cell. Tissue Res.* 233: 295-303.
- Smith, V., Söderhäll, K. (1983b) 1.3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Bull.* 16-t: 299-314.
- Smith, V., Söderhäll, K. (1991) A comparison of **phenoloxidase** activity in the blood of **ma-rine invertebrates**. *Develop. Comp. Immunol.* 15: 251-261.
- Söderhäll, K. (1982) **Prophenoloxidase activat-ing system and melanization - a recognition system of arthropods? A review**. *Develop. Comp. Immunol.* 6: 601-611.
- Söderhäll, K. (1992) **Biochemical and molecular aspects of cellular communication in arthro-pods**. *Boll. Zol.* 59: 239-265.
- Söderhäll, K., Unestam, T. (1979) Activation of serum prophenoloxidase in arthropod **immu-nity**. The **specificity of cell wall glucan activation** and activation by **purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase**. *Can. J. Microbiol.* 25: 406-414.
- Söderhäll, K., Ajaxon, R. (1982) Effect of qui-nones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp and extracellular protease of *Aphanomyces astaci*, a parasite on cray-fish. *J. Invertebr. Path.* 39: 105-109.
- Söderhäll, K., Smith, V. (1983) Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and **phenoloxi-dase** distribution. *Develop. Comp. Immunol.* 7: 229-239.

- Söderhäll, K., Håll, L. (1984) Lipopolysaccharide-induced activation of **prophenoloxidase activating system** in crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta* 797: 99-104.
- Söderhäll, K., Smith, V. (1986) **Prophenoloxidase activating cascade** as a recognition and defense system in arthropods. In: Gupta, A. (ed). **Hemocytic** and humoral immunity in arthropods. New York. Wiley Interscience 25 1-258.
- Söderhäll, K., Vey, A., Ramsteat, M. (1984) Hemocyte **lysate** enhanced of **fungal spore encapsulation** by crayfish hemocytes *Develop. Comp. Immunol.* 8: 23-29.
- Söderhäll, K., Smith, V., Johansson M. (1986) **Exocytosis** and uptake of bacteria by isolated haemocyte **populations** of two crustaceans: **evidence** for **cellular** co-operation in the **defense** reactions of arthropods. *Cell. Tissue Res.* 245: 43-49.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., Johansson, M. (1994) the prophenoloxidase activating **system** and its role in invertebrates defense. In: Beck, G., Harbecht, G., Cooper, E., Marchalonis, J. (eds). **Primordial immunity: Foundations for the Vertebrate Immune System.** Ann. NY **Acad. Sci.** 712: 155-161.
- Spycher, S., Arya, S., Isenman, D., Painter, R. (1987) A **functional**, thioestercontaining a **2-macroglobulin** homologue isolated from the hemolymph of the american lobster (*Homarus americanus*). *J. Biol. Chem.* 262: 14606-14611.
- Stöcker, W., Breit, S., Sottrup-Jensen, L., Zwilling, R (1991) α 2-macroglobulin from the haemolymph of the **freshwater crayfish** *Astacus astacus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 50 1-509.
- Sugumaran, M., Saul, S. J., Ramcsh, N. (1985) Endogenous protease inhibitors **prevent** undesired activation of **prophenolase** in insect hemolymph. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 112-119.
- Suzuki, T., Mori, K. (1994) Hemolymph **Iccitin** of the **pearl oyster**, *Pinctada fucata martensii*: a possible non-self recognition **system**. *Develop. comp. immunol.* 14: 161-173.
- Thörnqvist, O., Söderhäll, K. (1993) *Psorospermium haeckeli* and its interaction with the crayfish defense system *Aquaculture* 117: 205-213.
- Thörnqvist, P., Johansson, M., Söderhäll, K. (1994) Opsonic activity of cell adhesion **proteins** and **beta-1,3-glucan** binding proteins from two crustaceans. *Develop. Comp. Immunol.* 18: 3-12.
- Tyson, C., Jenkin, C. (1973) The importance of opsonic **factors** in the **removal** of bacteria from the circulation of the crayfish (*Parachanna bicarmatus*). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 51: 609-615.
- Vargas-Albores, F. (1992) Sistemas de defensa del camarón café (*Penaeus californiensis*) Ph. D. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vargas-Albores, F. (1995) The defense system of the **brown shrimp** (*Penaeus californiensis*). *J. Marine Biotechnol.* (enviado).
- Vargas-Albores, F., Ochoa, J. L. (1992) **Variations** of pH osmolality, sodium and **potassium** concentrations in the haemolymph of sub-adult shrimp (*Penaeus stylirostris*) **according** to size. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A: 1-5.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., Ochoa, J. L. (1991) Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en **acuicultura**. *Biotechnol.* 1: 17-25.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., Ochoa, J. L. (1992) **Size-dependence** hemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.* 103A: 487-491.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., Ochoa, J. L. (1993a) An anticoagulant solution for haemolymph collection and **prophenoloxidase** studies of **penacid** shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 299-303
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M. A., Ochoa, J. L. (1993b) A **lipopolysaccharide-binding** agglutinin haemolymph detected from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comp. Biochem. Physiol.* 104B: 407-413.

- Vargas-Albores, F., Jiménez-Vega, F., Söderhäll, K. (1995) A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. Develop. Comp. Immunol. enviado.
- Vasta G., Marchalonis, J. (1983) Humoral recognition factors in the Arthropoda. The specificity of chelicerata serum lectins. Amer. Zool. 23: 157-171.
- Vranckx, R., Durliat, M. (1981) Encapsulation of *Psorospermium haeckeli* by the haemocytes of *Astacus leptodactylus*. Experientia 37: 40-42.
- Yonemura, M., Kasatani, K., Asada, N., Ohnishi, E. (1991) Involvement of a serine protease in the activation of prophenoloxidase in *Drosophila melanogaster*. Zool. Sci. 8: 865-867.
- Yoshida, H., Ashida, M. (1986) Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem. 16: 539-545.