



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
DOCTORADO EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y
TECNOLÓGICO

TESIS

Caracterización bioquímica de los mecanismos de defensa en
Macrobrychium tenellum silvestre y cultivados

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO

PRESENTA:

M.C. DULCE MARIA MATEOS GUERRERO

DIRIGIDA POR:

DR. MARGARITO MARTÍNEZ CRUZ

CODIRIGIDA POR:

DR. JUAN JOSÉ ALPUCHE OSORNO

ASESORES:

DR. EDUARDO LORENZO PÉREZ CAMPOS
DR. IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO
DRA. ALMA DOLORES PÉREZ SANTIAGO
DR. CARLOS ALBERTO MATÍAS CERVANTES

OAXACA DE JUÁREZ, OAXACA, 07 DE NOVIEMBRE DE 2023.



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Doctorado en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez; Oax, 21/septiembre/2023
OFICIO No.DEPI/0828/2023
ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

C. DULCE MARIA MATEOS GUERRERO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO
PRESENTE.



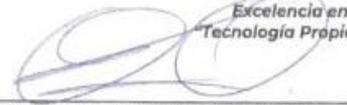
De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Tutorial le hizo respecto a su tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es:

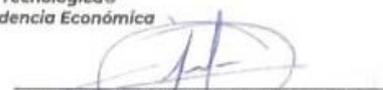
Caracterización bioquímica de los mecanismos de defensa en *Macrobrachium tenellum silvestre* y cultivados

Los abajo firmantes del H. Comité Tutorial le concedemos la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Tecnología Propia e Independencia Económica


DR. MARGARITO MARTÍNEZ CRUZ
DIRECTOR


DR. JUAN JOSÉ ALPUCHE OSORNO
CODIRECTOR

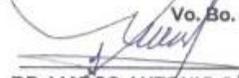
DR. EDUARDO LORENZO PÉREZ CAMPOS
ASESOR

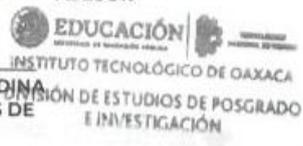
DR. IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO
ASESOR

DR. ALMA DOLORES PÉREZ SANTIAGO
ASESORA

DR. CARLOS ALBERTO MATÍAS CERVANTES
ASESOR

Vo. Bo.


DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Expediente
MASM/FDHP*



Avenida Ing. Victor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.
Tel. (951) 5015016 e-mail: correo@tecnm.mx | www.oaxaca.tecnm.mx



2023
Francisco
VILLA



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Oaxaca
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Doctorado en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

Oaxaca de Juárez, Oax, 21/septiembre/2023
OFICIO No.DEPI/0829/2023
ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

**C. DULCE MARIA MATEOS GUERRERO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO
PRESENTE.**

De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Tutorial le hizo respecto a su tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es:

Caracterización bioquímica de los mecanismos de defensa en *Macrobrachium tenellum* silvestre y cultivados

La división a mi cargo le concede la autorización para que proceda a la impresión de la misma.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
"Tecnología Propia e Independencia Económica"



EDUCACIÓN | **TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EDUCACIÓN | **TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN DESARROLLO
REGIONAL Y TECNOLÓGICO

RECIBIDO

c.c.p. Expediente
MASM/FDHP/



Avenida Ing. Victor Bravo Ahuja No. 125 Esquina Calzada Tecnológico, C.P. 68030.
Tel. (951) 5015016 e-mail: correo@tecnm.mx | www.oaxaca.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



CONACYT



CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, Oax el día 25 del mes Mayo del año 2023, la que suscribe Dulce María Mateos Guerrero estudiante de programa de Doctorado en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control D 19161617, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Dr. Margarito Martínez Cruz y cede los derechos del trabajo titulado Caracterización bioquímica de los mecanismos de defensa en *Macrobrachium tenellum* silvestres y cultivados, al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección: dulce.1010@hotmail.es.

Sí el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente

M.C. Dulce María Mateos Guerrero

Nombre y firma

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Características generales de <i>Macrobrachium tenellum</i>	3
2.2 El sistema inmune en los crustáceos	3
2.2.1 Respuesta humoral del sistema inmune de los crustáceos	5
2.2.2 Respuesta celular del sistema inmune de los crustáceos	7
2.3 Contenido bioquímico	11
2.3.1 Proteínas	12
2.3.2 Glucosa	13
2.3.3 Colesterol	14
2.3.4 Triglicéridos	14
2.3.2 Lípidos	15
2.3.3 Carbohidratos	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Colecta de organismos	19
5.2 Obtención de hemolinfa	19
5.3 Lisado celular	19
5.4 Cuantificación de proteínas totales	20
5.5 Electroforesis SDS-PAGE	20
5.6 Cuantificación de metabolitos	20
5.7 Análisis proteómico	21
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
6.1 Cuantificación de proteínas	23
6.2 Electroforesis SDS-PAGE	26
6.3 Cuantificación de metabolitos	28

6.4 Análisis proteómico	30
6.4.1. Exoesqueleto.....	31
6.4.2 Hemolinfa.....	31
6.4.3 Encapsulación.....	34
6.4.4 Coagulación.....	34
6.4.5 Fagocitosis.....	34
6.4.6 proPO.....	35
6.4.7 Lectinas.....	35
6.4.8 Vías de señalización.....	36
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. REFERENCIA	38
PARTICIPACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES	47
PUBLICACIONES	47
CONGRESOS	50
OTRAS PARTICIPACIONES	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pagina
6. 1 Proteínas totales presentes en la hemolinfa de <i>M. tenellum</i> de vida silvestre.	23
6. 2 Proteínas totales presentes en la hemolinfa de <i>M. tenellum</i> en condiciones de cautiverio.	24
6. 3 Concentración de proteínas totales en hemolinfa de <i>M. tenellum</i>	24
6. 4 Análisis estadístico prueba de t de proteínas totales en organismos de vida silvestre y cultivados.	25
6. 5 Niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma y hemolinfa de <i>M. tenellum</i> de vida silvestre.	29
6. 6 Niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma y hemolinfa de <i>M. tenellum</i> en cautiverio.	29
6. 7 Proteínas descritas en la hemolinfa de <i>M. tenellum</i>	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pagina
6. 1 Perfil electroforético de organismos de vida silvestre y en condiciones de cautiverio. A. Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standars, Kaleidoscope, BIORAD B. Bandas proteicas presentes en la hemolinfa de <i>M. tenellum</i> de vida silvestre con sus respectivos pesos moleculares C. Bandas proteicas presentes en la hemolinfa de <i>M. tenellum</i> en condiciones de cautiverio con sus pesos moleculares.	27

RESUMEN

Actualmente los estudios sobre la inmunidad de los langostinos, se ha centrado en la identificación y caracterización de mecanismos de defensa y factores que participan en la destrucción de patógenos, asimismo, diversos trabajos discuten sobre la bioquímica sanguínea demostrando que los metabolitos como proteínas, lípidos, carbohidratos, lactato, triglicéridos, colesterol, glucosa y hemocianina pueden ser utilizados como indicadores de la salud de los crustáceos. En el presente trabajo se estudió cuantitativamente los parámetros bioquímicos séricos en el langostino *Macrobrachium tenellum* en vida silvestre y en condiciones de cultivo, los niveles de los metabolitos en hemolinfa y plasma estudiados presentaron una diferencia entre las dos condiciones de vida y los niveles de metabolitos en plasma fueron más altos en comparación con los niveles que se han reportado, se encontraron 375 proteínas mediante un análisis de proteómica diferencial libre de marcaje, de las cuales 80 proteínas participan en los diferentes mecanismos de defensa de *M. tenellum*.

ABSTRACT

Currently, studies on the immunity of shrimps have focused on the identification and characterization of defense mechanisms and factors that participate in the destruction of pathogens, various works discuss blood biochemistry, demonstrating that metabolites such as proteins, lipids, carbohydrates, lactate, triglycerides, cholesterol, glucose and hemocyanin can be used as indicators of crustacean health. In the present work, the serum biochemical parameters were quantitatively studied in the shrimp *Macrobrachium tenellum* in the wild and under culture conditions, the levels of the metabolites in hemolymph and plasma studied presented a difference between the two living conditions and the levels of metabolites in plasma were higher compared to the levels that have been reported, 375 proteins were found by means of a label-free differential proteomics analysis, of which 80 proteins participate in the different defense mechanisms of *M. tenellum*.

I. INTRODUCCION

Los langostinos son susceptibles a enfermedades que pueden ser causadas por patógenos que se encuentran en su hábitat natural como en sistemas de cultivos (Berger, 2000), se sabe que la principal función del sistema inmune es diferenciar y eliminar todo material extraño presente en el organismo (Rendón y Balcázar, 2003), por lo que Cárcamo *et al*, (2016) han reportado que una vez que los patógenos atraviesan el exoesqueleto, que es la primera barrera de defensa, se activa una respuesta en cascada activando el sistema de fenol-oxidasa (proFO), encapsulación, nodulación y fagocitosis, mecanismos que son llevados por Hemocitos, células que han sido clasificadas en Hialinas, Semigranulares y Granulares.

Centeno *et al.*, (2007) afirma que la evaluación sanguínea proporciona datos que ayudan a realizar un diagnóstico o pronóstico de la morbilidad en una población, así como identificar situaciones de estrés y control de enfermedades que puedan surgir como resultado de estas condiciones, con la finalidad de mantener un estado de salud óptimo. Los parámetros bioquímicos en la hemolinfa se han utilizado actualmente para el control de las condiciones fisiológicas de ciertas especies de crustáceos; dentro de estos parámetros se encuentra la concentración de lactato, lípidos, triglicéridos, colesterol, proteínas y carbohidratos.

Se han realizado diversos trabajos de química sanguínea en crustáceos; por ejemplo: se demostró que los niveles de glucosa y las proteínas de la hemolinfa en *Litopenaeus vannamei* y *L. setiferus* son sensibles a diferentes tipos de dietas con diferentes niveles de proteínas y carbohidratos cuando estas especies se exponen a altas y bajas salinidades (Rosas *et al.*, 2001). También, se ha utilizado los niveles de colesterol, proteínas, triglicéridos y glucosa como indicadores de estrés en juveniles de *L. vannamei* (Racotta y Palacios 1998), así como indicadores de calidad de larvas y estado reproductivo (Palacios, 1999). La hemocianina es otro metabolito de la hemolinfa estudiado y resulto ser un indicador fisiológico en animales expuestos a una variedad de

condiciones ambientales, como altas concentraciones de amonio y nitrito, alta y baja salinidad e hipoxia (Rosas *et al.*, 2001).

El estudio de la respuesta inmune de los crustáceos es útil para crear métodos que mejoren la respuesta de defensa del hospedero contra patógenos, por ello, el control de enfermedades, los mecanismos de activación, regulación y de ataque de los crustáceos, así como los parámetros bioquímicos aún siguen siendo estudiado a detalle, por lo que, en el presente trabajo se estudió la química sanguínea de *M. tenellum* comparando dos condiciones de vida (cultivados y cautiverio) y el proteoma que participa en los mecanismos de defensa del langostino.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de *Macrobrachium tenellum*

M. tenellum se distribuye en México en Yavaros, Sonora y desde Baja California hasta el sur de la Península, también se puede encontrar desde en la isla Galápagos y el río Chira, en el Norte de Perú (Goodyear *et al.*, 1976; Guzmán *et al.*, 1981; Guzmán, 1987; Arroyo-Renteria y Magaña-Ríos, 2001; Jayachandran, 2001; Arzola-González y Flores-Campaña, 2008). Se localiza en aguas dulces y/o salobres, con temperaturas que oscilan entre los 16°C y los 32°C (Guzmán, 1987; Arroyo-Renteria y Magaña-Ríos, 2001; Jayachandran, 2001).

Suelen habitar en aguas con abundancia de detritus y en materia en diferentes grados de descomposición, cerca de los manglares, entre raíces sumergidas, plantas acuáticas, debajo de hojas y palos en descomposición y en fondos arenosos, limosos, limo-arcillosos, rocosos (Goodyear *et al.*, 1976; Arroyo-Renteria y Magaña-Ríos, 2001; Espino-Barr *et al.*, 2006).

Estos langostinos pueden ser tanto diurnos como nocturnos, pero suelen estar más activos de noche (Goodyear *et al.*, 1976), permaneciendo enterrados la mayor parte del día (Ponce-Palafox *et al.*, 2002). Son omnívoros y detritívoros y en ocasiones suelen ser caníbales (New, 2000); se alimentan de insectos, larvas, vegetales, pequeños crustáceos y moluscos, anélidos, detritus orgánico, restos de organismos y semillas (Goodyear *et al.*, 1976; Guzmán, 1987).

2.2 El sistema inmune en los crustáceos

La inmunidad de un organismo es la respuesta natural o adquirida a una enfermedad o al ataque de un agente infeccioso o tóxico (Cárcamo *et al.*, 2016). En los invertebrados su sistema inmune no cuenta con moléculas del tipo inmunoglobulina y células linfoides (Vargas-Albores, 1996) y diversos trabajos habían demostrado que los invertebrados carecían de un sistema inmune específico sin capacidad de memoria (Berger, 2000), pero recientemente se ha

demostrado en diferentes especies que mejoran su capacidad de supervivencia cuando se someten a una segunda infección con el mismo patógeno (Netea *et al.*, 2019). Cabe destacar que en el caso de los crustáceos su exoesqueleto es el que actúa como defensa y contiene sustancias antimicrobiales (Sugumaran, 1996) y cuando los patógenos han pasado por el exoesqueleto, las células llamadas hemocitos juegan un papel importante desencadenando diferentes mecanismos de defensa (Johansson *et al.*, 2000).

Autores como Söderhäll y Cerenius (1992) y Fredric y Ravichandran (2012) mencionan que los crustáceos cuentan con un sistema de circulación abierta y la hemolinfa es un análogo de la sangre que cubre los tejidos y cada sitio donde circula, el color de la hemolinfa es azul verdoso dado por una proteína llamada hemocianina, esta proteína de unión al cobre participa en el transporte de oxígeno y hemocitos (Levashina *et al.*, 2001). Según Bachère (2000), el sistema inmune de los crustáceos se divide en 3 fases:

- a) Etapa inducible e inmediata que corresponde a lo “no propio” debido a los factores de la hemolinfa que tienen una alta especificidad de reconocimiento (Destoumieux *et al.*, 1997; Vazquez *et al.*, 1998).
- b) Síntesis de efectores y etapa de defensa celular.
- c) Recuperación celular y etapa humoral.

Actualmente se ha demostrado que el sistema inmune innato está conformado por los mecanismos de defensa celulares donde participan los hemocitos, estos mecanismos son fagocitosis, encapsulación, coagulación, melanización y nodulación (Destoumieux *et al.*, 2000), y los componentes humorales que se encargan de activar y liberar las moléculas que se encuentran dentro de los hemocitos como son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), el sistema proPO y péptidos microbianos (Söderhäll y Cerenius, 1992).

2.2.1 Respuesta humoral del sistema inmune de los crustáceos

La respuesta humoral es un mecanismo que evita el desarrollo de bacterias, detiene la actividad enzimática y libera sustancias que provocan la lisis celular, precipitinas y aglutininas (Bachère *et al.*, 2000), esta respuesta también incluye la producción de péptidos antimicrobianos, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, todas las complejas cascadas enzimáticas que regulan la coagulación de la hemolinfa y la melanización así como la producción de todas aquellas moléculas asociadas al reconocimiento de agentes extraños; así que se puede entender que el mecanismo humoral es un conjunto de factores plasmáticos los cuales actúan en contra de los microorganismos, células extrañas y material abióticos, dentro de este tipo de respuesta podemos encontrar:

- **Proteínas de reconocimiento:** Las proteínas reconocedoras que se encuentran en el plasma son activadas por los agentes patógenos que atacan a los crustáceos (Rendón y Balcázar, 2003). En los camarones, se ha demostrado que dentro de las proteínas están involucrados los lipopolisacáridos (LPS) y los β -glucanos (Cárcamo *et al.*, 2016). Los lipopolisacáridos (LPS) forman parte de las paredes de las bacterias gram negativas y causan efectos inflamatorios, lo que activa los mecanismos de defensa del huésped (Espinosa *et al.*, 2002), mientras que los β -glucanos es el componente principal en las paredes de los hongos (Padhi y Verghese, 2008). Los mecanismos de defensa de los crustáceos son activados por un grupo de receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRP), estas proteínas pueden unirse a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), capaces de reconocer lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos (PGN), glucanos (β -1,3) glucano y manano en la superficie de microorganismos, posteriormente, estos receptores activan distintas cascadas de señalización celulares y humorales que regulan proteínas específicas relacionadas con el sistema inmune destinadas a eliminar los microorganismos patógenos (Medzhitov y Janeway, 2000; Lee y Sonderhall, 2001).

- **Péptidos antimicrobianos:** Son moléculas con funciones antibacterianas específicamente a bacterias Gram positivas (Destoumieux *et al.*, 2000), y se involucran en los mecanismos de defensa cuando son liberados por hemocitos y posteriormente se une a las superficies del exoesqueleto camarón (Destoumieux *et al.*, 1999). La actividad de los PAM's se inicia en la membrana citoplasmática ya que la mayoría de ellos permeabiliza la membrana microbiana llevando a la formación de canales de iones, poros transmembrana o rupturas de membrana extensivas, hay péptidos que no forman poros, pero su actividad antimicrobiana es menor (Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016).
- **Sistema Profenoloxidasa:** La fenoloxidasa, es una tirosin-kinasa, proteína que se encarga de señalización intracelular y en los crustáceos se encuentra en los hemocitos como una enzima llamada profenoloxidasa (proFO) (Fagutao *et al.*, 2011). Una vez que el contenido granular es liberado mediante degranulación, la proFO es activada en fenoloxidasa (FO) y esta a su vez cataliza la reacción en la que la tirosina se convierte en dihidroxifenilalanina (DOPA) y después en DOPA-quinona, que es el precursor de la melanina, la que dará paso a la activación de la melanización debido a que el sistema proFO es estimulado por componentes de la pared celular de los microorganismos activa a las respuestas tipo celulares como fagocitosis, encapsulación, nodulación y melanización (Vázquez *et al.*, 2009).
- **Lectinas:** son proteínas o glicoproteínas, su función es reconocer específicamente los carbohidratos en la membrana o superficie de las células principalmente reconocen N-acetilados, en especial derivados del ácido siálico y sialoglicoconjugados, participan en la fagocitosis como opsoninas (Marques y Barracco, 2000; Sahoo *et al.*, 2007). Las lectinas han sido clasificadas de acuerdo a algunas propiedades químicas como lectinas tipo C, que requieren de calcio para su funcionamiento y las Lectinas tipo S, las cuales requieren de tioles libres para su estabilidad (Marques y Barracco, 2000) Estas también participan en varios procesos biológicos como la

adhesión celular, opsonización y formación de nódulos (Lee y Söderhäll, 2002).

2.2.2 Respuesta celular del sistema inmune de los crustáceos

Los hemocitos son las células sanguíneas análogas a los glóbulos blancos de los vertebrados (Roch, 1999), estas células se originan en los tejidos hematopoyéticos que se encuentran en la parte dorsal de las paredes del estómago rodeadas de tejido conectivo, se ha observado la presencia de una cadena de ganglios, donde se cree que hay células precursoras de hemocitos (Ching, 2005).

Los hemocitos en los crustáceos se encargan de eliminar las partículas extrañas y agentes infecciosos (Raa, 1996), también participan en el proceso de nodulación, coagulación, fagocitosis, melanización, encapsulación, citotoxicidad y lisis de las células extrañas (Johansson *et al.*, 2000), en el endurecimiento del exoesqueleto, coagulación de metabolitos de carbohidratos, cicatrización de daños en el exoesqueleto, transporte y almacenamiento de aminoácidos y proteínas (Martínez, 2007). Por otro lado, la presencia de hemocitos en las branquias y la glándula digestiva permite una alta capacidad para aislar los agentes infecciosos en los lugares de mayor contacto con el medio ambiente (Pascual *et al.*, 2003b).

Se han utilizado características morfológicas, antigénicas y funcionales para identificar y clasificar a los hemocitos (Rodríguez, 1996); logrando describir tres tipos de hemocitos que son:

- **Hemocitos hialinos:** tienen un tamaño de $3.35 \times 4.76 \mu\text{m}$ (Johansson *et al.*, 2000) de suelen ser ovoides a esféricos con cromatina nuclear dispersa, la envoltura celular es lisa (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004), tienen un delgado citoplasma basófilo, un núcleo ovoide grande y céntrico, escaso retículo endoplásmico liso y rugoso y ribosomas; no tienen gránulos ni aparato de Golgi (Battistella *et al.*, 1996), se adhieren y extienden con facilidad (Johansson y Söderhäll, 1989) participan en la respuesta fagocítica

y en la coagulación (Raa, 1996), también son los más abundantes durante la muda.

- **Hemocitos semigranulados:** son ovoides, con un tamaño promedio reportado de $4.16 \times 7.18 \mu\text{m}$ (Johansson *et al.*, 2000; Laxmilatha y Laxminarayana, 2004), poseen muchos gránulos pequeños en forma redonda, su núcleo es esférico (Destoumieux *et al.*, 2000), bilobulado y central o excéntrico, posee dos o más aparatos de Golgi, ribosomas libres y retículo endoplásmico (Laxmilatha y Laxminarayana, 2004), éstas células fagocitan, encapsulan e intervienen en la liberación del sistema profenoloxidasa proPO y melanización; también, sintetizan y liberan peneidina (Destoumieux *et al.*, 2000).
- **Hemocitos granulados:** son ovoides, su tamaño suele más grande que los demás hemocitos, tiene un tamaño promedio que han reportado de $4.72 \times 5.85 \mu\text{m}$ (Johansson *et al.*, 2000; Laxmilatha y Laxminarayana, 2004), poseen gránulos grandes, inclusiones citoplasmáticas, un retículo endoplásmico liso, pocas vacuolas, núcleo pequeño, excéntrico y bilobulado, ribosomas libres en citoplasma, una relación citoplasma-núcleo y excéntrico; estos hemocitos granulares guardan enzimas que forman el sistema proPO en los crustáceos, estas enzimas mediante exocitosis son liberadas y la proteína fijadora de β -glucanos y la peroxinectina estimulan a los hemocitos (Smith y Söderhäll, 1983). Además, participan en el mecanismo de encapsulación (Destoumieux *et al.*, 2000).

En los crustáceos se han reportado las siguientes respuestas celulares:

- **Nodulación:** la formación de nódulos se realiza cuando por medio de fagocitosis no se puede eliminar a los microorganismos que atacan al crustáceo, en este mecanismo las partículas extrañas son eliminadas de la circulación hemolinfática, los nódulos atrapan a las partículas extrañas y se forman pequeñas capsulas en donde algunos hemocitos se desprenden y se filtran en la masa bacteriana intentando fagocitarla; por lo que los microorganismos son atrapados por varios hemocitos y el nódulo es

fuertemente melanizado por una gran actividad fenoxidasa (Söderhäll y Cerenius, 1992).

- **Encapsulación:** consiste en 5-30 capas compactadas de hemocitos, sin espacios intracelulares (Vázquez *et al.*, 2009), en este mecanismo se eliminan los microorganismos que no pueden ser destruidos por las respuestas humorales (Vázquez *et al.*, 1998), y también actúa cuando algún cuerpo extraño es muy grande que impide ser fagocitado (Söderhäll y Cerenius 1992), entonces la acción de las hidrolasas y quinonas y la concentración de oxígeno disminuye para que se pueda destruir a los microorganismos encapsulados (Vasta *et al.*, 1999).
- **Coagulación:** es el cierre de las heridas del exoesqueleto para prevenir la pérdida de hemolinfa y evitar el paso a partículas extrañas al organismo (Söderhäll y Cerenius, 1992). Para formar el coagulo la hemolinfa deberá coagular a través de una cascada enzimática donde intervienen enzimas proteolíticas, estas enzimas van a hidrolizar a una proteína llamada coagulígeno, que se va a transformar en coagulina y posteriormente se va a polimerizar formando el coagulo (Montaño-Pérez *et al.*, 1999).
- **Melanización:** Este mecanismo de defensa involucra el sistema profenoloxidasa FO (Vázquez *et al.*, 1998; Perdomo-Morales *et al.*, 2007), como respuesta a la reparación de heridas y de microorganismos que atacan el hemocele, la hidroxilación de los monofenoles y oxidación de los difenoles a quinonas se eleva, por lo que las quinonas son transformadas en melanina mediante reacciones no enzimáticas, posteriormente, la melanina se une a la superficie de las bacterias aumentando la adhesión de hemocitos a la bacteria que será eliminada por formación de nódulos (Fagutao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015), cabe mencionar que la melanina, es un pigmento pardo negrozco encargado de inactivar partículas extrañas y evitar que se distribuyan en el cuerpo del crustáceo, también participa en la cicatrización de los daños causados en el exoesqueleto (Rendón y Balcázar, 2003; Smith y Söderhäll, 1983).
- **Fagocitosis:** es la eliminación de agentes extraños en el hemocele (Johnson, 1987), las proteínas y virus de tamaño pequeño son eliminados

por los fagocitos, estas células se localizan en la hemolinfa o sobre la superficie de las arteriolas del hepatopáncreas, branquias y en la glándula antenal del crustáceo (Rodríguez, 1996; Iwanaga y Lee, 2005). Las células fagocíticas se encargan de destruir a los microorganismos a través de dos mecanismos de defensa diferentes: anaerobio y aerobio. El mecanismo aerobio se relaciona con el estallido respiratorio y utiliza NADPH o NADH como donadores de electrones. Durante este proceso, un electrón del oxígeno se reduce para formar el radical superóxido (O_2^-), que luego se convierte a peróxido de hidrogeno espontáneamente o por acción de la superóxido dismutasa (SOD), que formara una molécula de oxígeno, por otro lado, en el mecanismo anaerobio los péptidos antimicrobianos y la acción de enzimas microbicidas como las lisozimas son los responsables de este mecanismo (Nappi y Ottaviani, 2000). El proceso de la fagocitosis se inicia con la infección del organismo y cuenta con varias etapas que son: quimiotaxis, ingestión o endocitosis y exocitosis (Nappi y Ottaviani, 2000) que se describen a continuación:

Infección: todos los microorganismos que penetran al cuerpo lo hacen a través de lesiones, una vez establecidos en los tejidos del cuerpo, los microorganismos proliferan liberando en los tejidos péptidos con actividad quimiotáctica (Rojas-Espinoza, 2006).

Quimiotaxis: en este proceso las células fagocíticas acuden a los sitios de lesión, por lo que primero deben de salir de los vasos sanguíneos. Los cambios físicos observados durante la salida de las células incluyen, primero el flujo de los leucocitos, después su desplazamiento por rodamiento sobre la superficie interna de los vasos sanguíneos, más tarde su marginación, adhesión y expansión sobre el endotelio vascular, y finalmente su salida por diapédesis a través de las uniones entre las células endoteliales (Rojas-Espinoza y Arce-Paredes, 2003). También dentro de este proceso las células fagocíticas incrementan la síntesis de sus proteínas de adhesión y se vuelven más pegajosas entre sí.

Ingestión o endocitosis: las células responden al contacto con los microorganismos, extendiendo su membrana y emitiendo prolongaciones a

manera de pseudopodos que terminan por rodear y englobar a los microorganismos, en este momento los microorganismos ya se encuentran en el interior de las células, contenidos en sus estructuras conocidas como vacuolas fagocíticas o fagosomas (Rojas-Espinoza, 2006). Rojas-Espinoza y Arce-Paredes, (2003) señalan que este proceso comprende la invaginación de la membrana plasmática alrededor del material extracelular, formando una vacuola fagocítica; en la mayoría de los casos, la vacuola se fusiona, reversiblemente, con los lisosomas para dar origen a la vacuola digestiva o fagosoma, esta fusión permite el contacto de la partícula fagocitada con las hidrolasas lisosomales del fagocito como resultado de esta actividad, continuamente se remueven porciones de la membrana plasmática para formar la envoltura de la vesícula endocítica.

Exocitosis: Los microorganismos ingeridos se mueren por el efecto toxico de los metabolitos el oxígeno y el nitrógeno, pero su digestión es el resultado de la actividad de las enzimas hidrolitcas lisosomales. las hidrolasas degradan a los componentes microbianos hasta fragmentos de tamaño variable (lípidos, polipéptidos, oligosacáridos, y sus unidades monomericas) que luego son reutilizados por la célula en beneficio de su propio metabolismo anabólico, mientras que otros son desechables por exocitosis, un proceso esencialmente inverso a endocitosis (Rojas-Espinoza, 2006).

2.3 Contenido bioquímico

La bioquímica sanguínea se encarga de la detección de minerales, enzimas y substratos, que se encuentran en el suero o plasma (Thrall *et al.*, 2012). Los perfiles bioquímicos son utilizados principalmente en la acuicultura mexicana para evaluar la salud y la presencia de enfermedades infecciosas que pueden causar alteraciones musculares, renales, hepáticas, desbalance nutricional, efectos tóxicos, condiciones anóxicas, (Hrubec *et al.*, 2000; Aydin *et al.*, 2000; Silveira-Coffigny *et al.*, 2005), también proveen información sobre cambios en las características del agua y estados de polución a los que son sometidos (Hrubec *et al.*, 2000).

Se ha reportado que los metabolitos como la glucosa, lactato, proteínas, lípidos y carbohidratos son utilizados para medir el efecto del estrés en camarones y se ha realizado mediante estímulos en tejidos, hepatopáncreas, musculo y branquias (Pascual *et al.*, 2006).

2.3.1 Proteínas

Las proteínas son biomoléculas orgánicas están compuestas por C, H, O, P, S y cantidades más pequeñas de los elementos Fe, Cu y Mg. Son polímeros de aminoácidos (aa) no ramificados que se conectan mediante enlaces peptídicos; estas moléculas son las más frecuentes en los organismos vivos. Su importancia radica en la variedad de funciones diferentes que pueden desempeñar siendo los componentes principales de las rutas metabólicas de las células (Lehninger, 1989; Sosa, 2012).

Las proteínas cumplen una variedad de funciones, incluidas funciones estructurales, metabólicas y de transporte, como resultado, son esenciales para la vida misma y el funcionamiento de todas las células. Las proteínas participan en varios procesos celulares debido a su heterogeneidad estructural, también intervienen en los procesos metabólicos de los organismos como la catálisis enzimática, algunas proteínas participan en el movimiento y la contracción de los músculos (Garrido *et al.*, 2005; Guillén, 2009).

La mayoría de los trabajos relacionados con el contenido proteico en crustáceos se basan principalmente en el aumento del peso de organismos alimentados con dietas comerciales o purificadas en condiciones controladas de laboratorio (Martínez, 1999). Aminoácidos como la lisina, arginina, metionina, valina, histidina, leucina, fenilalanina, treonina, isoleucina y triptófano han sido identificados como esenciales para las especies *Metanephrops japonicus*, *F. aztecas*, *Penaeus monodon* y camarones peneidos (Lim y Akiyama, 1995). En el camarón *Litopenaeus setiferus* se observó que el nivel proteico presente en el musculo y la hemolinfa suele disminuir cuando son sometido a estrés y a temperaturas mayores a los 33°C (Pascual *et al.*, 2003b), en esta misma especie de camarón compararon

el nivel de proteína en hemolinfa de organismos silvestre y aclimatados y se demostró que el nivel de proteína disminuye al ser aclimatados a 27°C y 30°C (Sánchez *et al.*, 2001), por otro lado en los camarones *Penaeus monodon* y *Penaeus japonicus* se observó que la concentración de proteína en hemolinfa disminuye cuando son expuestos a altos niveles de amonio y baja salinidad (Chen *et al.*, 1994).

2.3.2 Glucosa

La glucosa es la principal fuente de energía en crustáceos por lo que se ha utilizado como parámetro para evaluar el estrés y para medir la calidad de los crustáceos cultivados (Lu *et al.*, 2016). En los crustáceos la hormona hiperglucémica (HCG) se encarga de controlar el nivel de glucosa presente en la hemolinfa y puede inducir a que los niveles de glucosa en la hemolinfa aumenten durante el estrés (Chung *et al.*, 2010).

Los estudios en crustáceos se ha demostrado que en *L. setiferus* cuando se exponen a temperaturas superiores a 33°C origina que en la hemolinfa el nivel de glucosa disminuya, mientras que en condiciones de hipoxia los camarones suelen metabolizar la glucosa hasta lactato a través del metabolismo anaerobio aumentando su nivel en la hemolinfa (Aparicio-Simón *et al.*, 2010). En los cangrejos se ha reportado que el nivel de glucosa está relacionado con el ritmo circadiano, la exposición al aire, contaminantes, agresión y aumento de la salinidad o temperatura (Lu *et al.*, 2016). También se ha reportado que los crustáceos suelen almacenar la glucosa en forma de glucógeno en branquias, hepatopáncreas y musculo posteriormente lo utilizan ante situaciones de hipoxia, salinidad e inanición (Buckup *et al.*, 2008).

Recientemente se han realizado estudios para medir el nivel de glucosa en la hemolinfa utilizando medidores portátiles, en el cangrejo *Cancer pagurus*, se utilizó el medidor One touch ultra para medir el nivel de glucosa evaluando el nivel de estrés después de haber sido sometido a diferentes sistemas de transporte (Aliko *et al.*, 2015), mientras que en cangrejo *Scylla serrata* midieron su nivel de glucosa

en la hemolinfa utilizando el medidor Accutrend Plus (Butcher *et al.*, 2012), a pesar que el uso de los medidores portatiles es un método comúnmente usado para medir glucosa, en invertebrados ningún estudio ha evaluado su relevancia.

2.3.3 Colesterol

Se ha demostrado que el colesterol es el pionero de esteroides como los ácidos biliares, hormonas sexuales, hormonas esteroides, y control de muda en insectos y crustáceos. En un estudio enfocado a camarones peneidos se llegó a la conclusión que el colesterol en la hemolinfa disminuye por hipotermia y por una exposición a niveles altos de amonio y en otro estudio se demostró que ocurre lo mismo en hepatopáncreas y musculo, pero ante hipoxia (Racotta y Hernandez, 2000; Silva-Castiglioni *et al.*, 2010).

2.3.4 Triglicéridos

Los triglicéridos constan de tres cadenas de ácidos grasos que se encuentran unidos a una molécula de glicerol mediante un enlace éster. Se sabe que en los crustáceos peneidos su hepatopáncreas contiene el 18% de los lípidos totales del organismo y son los triglicéridos los que predominan, los triglicéridos son esenciales para proporcionar energía al camarón (Bray *et al.* 1990) al aportar mayor energía metabólica que las proteínas y los carbohidratos (Newsholme y Leecha, 1983).

Santos *et al.*, (1997) demostraron que en el cangrejo *Carcinus maenas* los niveles de triglicéridos y fosfolípidos en la hemolinfa aumentan cuando se les inyecta la hormona CHH que es la hormona hiperglucémica de crustáceos, en un estudio se usaron organismos juveniles del camarón *L. vannamei* estos fueron expuestos a condiciones hiper-osmóticas y observó que los niveles de triglicéridos en la hemolinfa aumentaron cuando se les administraba inyecciones de hormonas recombinantes CHH-B1 Y CHH-B2 (Camacho-Jimenez *et al.*,2017). En el camarón *L. setiferus* sus niveles de triglicéridos presentes en hepatopáncreas, musculo y hemolinfa suelen disminuir cuando son expuestos a temperaturas mayores a 33°C (Pascual *et al.*, 2003b), en cuanto al camarón *L. vannamei* sus niveles de

triglicéridos bajan durante su aclimatación a temperaturas de 27°C y 31°C (Mercier *et al.*, 2006)

2.3.2 Lípidos

Los lípidos son moléculas biológicas con estructuras químicas bastantes simples e insolubles en agua (Randall, *et al.*, 1998). Mientras que los esteroides y los fosfolípidos son componentes de la membrana celular, las grasas y los aceites son las principales formas de almacenamiento de energía. En pequeñas cantidades, otros lípidos son agentes emulsionantes, cofactores enzimáticos, transportadores electrónicos, hormonas y mensajeros intracelulares (Lehninger, 1989).

Se ha reportado que los crustáceos no son capaces de sintetizar a los fosfolípidos, pero en un estudio en el camarón *Atya spinipes* se observó que las gotas lipídicas de las células hepatopancreáticas podrían ser sintetizadas a partir de los ácidos grasos y el glicerol que se producen durante la digestión gástrica (Van Weel, 1955), pero trabajos posteriores demostraron que los lípidos digeridos se absorben en forma de 2-monoglicéridos y ácidos grasos y son sintetizados los triacilglicéridos para formar los lípidos de reserva. Santos *et al.*, (1997) demostró que los lípidos totales en la hemolinfa en el cangrejo *N. granulata* disminuyen al administrarle inyecciones de la hormona hiperglucémica del crustáceo CHH.

2.3.3 Carbohidratos

Los carbohidratos están formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, se dividen en polisacáridos, oligosacáridos y monosacáridos, estos se utilizan principalmente como fuentes de energía química almacenada (glucógeno) o inmediata (glucosa 6-fosfato). Aunque, también pueden convertirse en ácidos grasos, esteroides, aminoácidos o intermediarios metabólicos. Son utilizados como material de estructura porque participan en la síntesis de quitina que es necesaria para los insectos y crustáceos para formar su exoesqueleto (Randall, *et al.* 1998).

El estudio de los carbohidratos en crustáceos es muy escaso y se ha llegado a concluir que estos organismos no tiene sitios para almacenar y tampoco la capacidad para procesar enzimas (Rosas, *et al.* 2000), por lo que se sugiere que la mejor opción para que los carbohidratos sean digeridos por los crustáceos es mediante una dieta en forma de almidón (D´Abramo y Conklin, 1995), aunque también se sabe que debido a la limitante física que presentan las células para almacenar este nutriente, el exceso de carbohidratos produce daños y en las branquias y en el hepatopáncreas (Pascual, *et al.* 1983).

III. HIPÓTESIS

Ho: La concentración de metabolitos (glucosa, colesterol y triglicéridos) y proteínas de la química sanguínea, así como el proteoma del sistema inmune en organismos cultivados será diferente en organismos silvestres.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer cuantitativamente, parámetros bioquímicos séricos, relacionados con los principales mecanismos de defensa del langostino *Macrobrachium tenellum* en vida silvestre y en condiciones de cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la concentración de proteína totales de la hemolinfa del langostino en vida silvestre y cultivados.
- Estudiar los cambios en perfiles electroforéticos de la hemolinfa del langostino en vida silvestre y cultivados.
- Cuantificar la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos totales, en plasma y hemolinfa de *Macrobrachium tenellum*.
- Analizar el proteoma del sistema inmune y de cada mecanismo de defensa en *Macrobrachium tenellum*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de organismos

Se colectaron especímenes de *M. tenellum* mediante muestreos periódicos en la región de Boca Barra del Rio Colotepec situado en el municipio de Santa María Colotepec en la Costa de Oaxaca; los langostinos fueron mantenidos en cautiverio en las instalaciones de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca en el Modulo Demostrativo de Producción e Investigación Acuícola (MODEPIA), localizado en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; se usaron tanques negros ovalados de 9 m² de superficie, fueron acondicionados con flujo continuo y aireación, con una temperatura de 28°C y fueron alimentados dos veces al día con camaronina® (Purina) durante 3 semanas antes de ser utilizados para reducir el estrés producido por la captura.

5.2 Obtención de hemolinfa

La hemolinfa fue colectada por punción del seno pericardial, en la base del primer segmento abdominal utilizando una aguja de 21g x 32mm, la muestra se colocó en tubos Eppendorf estériles con anticoagulante (Citrato de Sodio 5%), y se almacenó a -40°C hasta su uso.

5.3 Lisado celular

Se realizó lisado celular mediante 5 ciclos de choque térmico, (sin diferenciar hemocitos hialinos, semi-granulares y granulares), por lo que la muestra fue almacenada a -80°C durante 24 horas, después la muestra fue colocará en baño maría a 37°C durante 2 minutos, posteriormente fue colocada a -40°C durante 20 minutos y después a baño maría por 2 minutos, este procedimiento se repitió hasta completar los 5 ciclos de choque térmico. La muestra fue guardada a -40°C hasta uso.

5.4 Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó la muestra lisada y el Kit BCA Protein Assay (BioRad, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante; se usaron 25 μ l de la muestra y se colocó en la placa de 96 pozos, junto con 200 μ l del reactivo BCA. La placa de 96 pozos fue incubada a 37°C durante 30 min, posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de placas (Thermo scientific 357), los valores de proteínas (mg/ml) fueron calculados usando la D.O. promedio de cada muestra usando una ecuación cuadrática de la curva de BCA.

5.5 Electroforesis SDS-PAGE

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida mediante el sistema discontinuo o de Laemmli (1970), en el cual se utilizaron dos tipos de geles un gel concentrador al 5% y un gel separador al 12.5%. Se hizo una dilución 1:1 de la muestra lisada y buffer de Laemmli 2x por lo que se colocó 2 μ l con 2.978 μ g/ μ l de proteína total para organismos silvestres y 2.282 μ g/ μ l de proteína total para organismos cultivados, posteriormente las muestras fueron incubadas a 98°C durante 5 minutos, después se llevó a cabo la corrida electroforética a 100 V constante. Una vez terminada la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie (BioRad, USA) durante toda la noche y posteriormente se destiñó con solución decolorante.

5.6 Cuantificación de metabolitos

Para determinar los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos se usaron muestras de plasma y hemolinfa de *M. tenellum* de vida silvestre y cultivados, se usaron Kits comerciales (glucosa BioSystems REF 11504, triglicéridos Byo Systems REF 11529, colesterol BioSystems REF 11506), con los que se evalúan reacciones enzimáticas colorimétricamente, las cuales cambian de color en respuesta a las diferentes concentraciones de los metabolitos. Estos kits cuentan con el reactivo listo para usar por lo que se usaron siguiendo las indicaciones del fabricante; las muestras se hicieron por duplicado.

Para determinar los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos (mg/dl) se hicieron los siguientes cálculos:

- Glucosa:

$$\text{concentracion} \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO estandar}} \times 100$$

- Colesterol y triglicéridos

$$\text{concentracion} \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO estandar}} \times 200$$

5.7 Análisis proteómico

Para este análisis se extrajo hemolinfa por punción y fue colocada en tubos Eppendorf con anticoagulante (Citrato de Sodio 5%), se dejaron las muestras a -80°C durante 24 hrs, posteriormente se hicieron 5 ciclos de choque térmico (10 min a -80°C, 2 min a 37°C en baño maría), después de la lisis celular, los extractos de las proteínas fueron liofilizados y enviados para su análisis proteómico a la empresa Creative Proteomics (Shirley, NY, EUA), donde las muestras fueron colocadas en tripsina y se cuantificaron utilizando un nanoLC-MS/M.S. plataforma de la siguiente manera:

Para la preparación de la muestra se transfirió 5 mg de proteína disueltos en 200 µl de bicarbonato de amonio 50 mM a dispositivos Microcon YM-10 (Millipore) y se centrifugo a 12.000 g a cuatro °C durante 10 min, posteriormente se añadió 200 µl de bicarbonato de amonio (50 mM), seguido por centrifugación y se repitió una vez. Después, se redujo con DTT diez mM a 56°C durante 1 h y se alquiló con IAA 20 mM a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 h; el dispositivo se centrifugó a 12.000 ga 4°C durante 10 minutos y se lavó una vez con bicarbonato de amonio 50 mM. Luego se agregao 100 µl de bicarbonato de amonio 50 mM y tripsina libre a la solución de proteína en una proporción de 1:50 y se incubamos a 37 °C durante

la noche. Finalmente, el dispositivo se centrifugó a 12.000 ga 4°C durante 10 min. A continuación, se añadieron 100 µl de bicarbonato de amonio 50 mM, se centrifugaron y se repitieron una vez. Los péptidos extraídos se liofilizaron. Todos los péptidos se resuspendieron en 2-20 µl de ácido fórmico al 0,1% antes del análisis LC-MS/MS.

La cromatografía líquida se realizó en un easy-nLC1000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.); utilizando una Nanocolumna (columna de fabricación propia de 100 µm x 10 cm empaquetada con una resina ReproSil-Pur C18-AQ de fase inversa, 3 µm, 120 Å, Dr. Maisch GmbH, Alemania); el volumen de muestra cargado fue de 5 µl; la fase móvil fue A: 0,1 % de ácido fórmico en agua; B: 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo. El caudal total se ajustó a 600 nL/min. LC El gradiente lineal varió de 6 % a 9 % B durante 8 min, de 9 % a 14 % B durante 16 min, de 14 % a 30 % B durante 36 min, de 30 % a 40 % B durante 15 min y de 40 % a 95 % B durante 3 min, eluyendo con 95 % B durante 7 min.

Para la espectrometría de masas, se utilizó un voltaje de pulverización de 2,2 kV; la temperatura capilar fue de 270°C; EM. los parámetros fueron resolución: 60000 a 400 m/z, rango precursor m/z: 300,0-1650,0; Los parámetros de MS/MS fueron el rango de escaneo de iones del producto, comenzando desde m/z 100. La MS/MS dependiente de los datos fue hasta los 5 iones peptídicos más intensos del escaneo de vista previa en Orbitrap.

Las proteínas se analizaron y caracterizaron mediante la base de datos Uniprot e Interpro utilizando el número de identificación respectivo a cada proteína, posteriormente, se clasificaron los términos G.O. (Clasificación: GoSlim2) utilizando la herramienta CateGORizer del Programa de Investigación del Genoma Animal (www.animalgenome.org/tools/catego) sobre componentes celulares, función molecular y procesos biológicos. los términos GO se usan como atributos de los productos génicos por parte de las distintas bases de datos, facilitando así las búsquedas estandarizadas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas fue calculada mediante el programa Excel que permitió obtener la concentración de proteína (mg/ml) que se encuentra en cada una de las muestras y se puede observar en la Tabla 6.1 la concentración de proteínas en organismos de vida silvestre, en la tabla 6.2 se observa la concentración de proteínas presentes en organismos en condiciones de cautiverio y por último en la tabla 6.3 se puede apreciar la concentración de proteínas totales presentes en las dos condiciones de vida.

Tabla 6. 1 Proteínas totales presentes en la hemolinfa de *M. tenellum* de vida silvestre.

Muestra	R ² curva	Proteína (mg/ml)
1	0.9809	1.251
2	0.9809	1.880
3	0.9809	1.136
4	0.9809	1.117
5	0.9809	1.743
6	0.9809	1.777
7	0.9809	1.105
8	0.9809	1.619
9	0.9809	1.874
10	0.9809	1.343
11	0.9809	1.541

Tabla 6.1. 11 muestras en las que se determinaron proteínas tuvieron una concentración similar de proteínas totales, por lo que la concentración de proteína promedio presente en la hemolinfa de *M. tenellum* de vida silvestre es de 1.489 mg/ml.

Tabla 6. 2 Proteínas totales presentes en la hemolinfa de *M. tenellum* en condiciones de cautiverio.

Muestra	R² curva	Proteína (mg/ml)
1	0.9955	1.130
2	0.9955	1.077
3	0.9955	1.016
4	0.9955	1.068
5	0.9955	1.173
6	0.9955	1.188
7	0.9955	1.240
8	0.9955	1.200
9	0.9955	1.187
10	0.9955	1.215
11	0.9955	1.064

Tabla 6.2 En la determinación de proteínas totales de *Macrobrachium tenellum* en condiciones de cautiverio se usaron 11 muestras las cuales presentaron una concentración similar obteniendo una concentración de proteína promedio de 1.141 mg/ml.

Tabla 6. 3 Concentración de proteínas totales en hemolinfa de *M. tenellum*.

Condición de vida de <i>M. tenellum</i>	Proteína (mg/ml)
Organismos silvestres	1.489
Organismos cultivados	1.141

Tabla 6.3 Se aprecia la concentración total de proteínas presentes en las dos condiciones de vida, teniendo para organismos de vida silvestre una concentración de proteínas totales de 1.489 mg/ml y para organismos cultivados la concentración total fue de 1.141 mg/ml.

mencionan que el estrés nutricional afecta los niveles de proteínas en la hemolinfa, y no el estrés causado por la manipulación, lo que indica que los niveles de proteínas en hemolinfa pueden reflejar cambios en la salud del camarón, incluida

la respuesta inmune. La concentración de proteína promedio obtenida en ambas condiciones de vida son similares, cabe mencionar que para ambas condiciones la hemolinfa no fue estimulada por lo que se sugiere que tanto para la hemolinfa proveniente de organismos en vida silvestre como en cautiverio presentan proteínas similares que las ayuda en su mecanismo de defensa.

Tabla 6. 4 Análisis estadístico prueba de t de proteínas totales en organismos de vida silvestre y cultivados.

Prueba para una muestra

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
proteina_silvestre	15.974	10	.000	1.489636	1.28186	1.69742
proteina_cultivados	50.962	10	.000	1.141636	1.09172	1.19155

Mediante el análisis estadístico prueba de t (Tabla 6.4) se comparó la concentración de proteínas totales de organismos silvestres con la concentración total de proteínas en organismos cultivados y se pudo observar una diferencia significativa, por lo que la concentración de proteína es mayor en organismos de vida silvestre, teniendo una concentración de 1.489 mg/ml, esto se puede deber a que en vida silvestre su tipo de dieta no es controlado factor que puede afectar la concentración en hemolinfa y que debe ser analizado exhaustivamente.

Actualmente se cuenta con investigaciones relacionadas a la concentración de proteínas, pero aún no se ha reportado la concentración de proteínas en hemolinfa pura y en las investigaciones realizadas se han utilizado el método de bradford, que es una técnica diferente a la que se ha realizado en este estudio. Las investigaciones con las que cuentan se han centrado en la determinación de proteínas después del uso de inmunoestimuladores o diferentes dietas y se ha

estudiado en *Macrobrachium rosenbergui* y en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

En un experimento se valoró el efecto de inmunoestimuladores de levaduras y bacterias muertas por calor en la alimentación del camarón blanco con cuatro diferentes dietas, se determinó la concentración de proteínas en el plasma usando el método de Bradford (1976), y obtuvieron la concentración de proteínas en la dieta control (Camaronina) de 88.6 mg/mL en el alimento diario con inmunoestimuladores fue de 91.7 mg/mL, en la alimentación de cada 3 días fue de 102 mg/mL y en la alimentación de cada 6 días fue de 87.1 mg/mL

En el camarón blanco también se ha evaluado la concentración de proteína en la hemolinfa, pero comparando distintas dietas en animales mantenidos en laboratorio y estanques, se obtuvo que en organismos de condiciones de laboratorio la concentración de proteína fue de 152 ± 81 mg/ml mientras que en animales mantenidos en estanques fue de 224 ± 64 mg/ml. A pesar de que en ambos trabajos han medido la concentración de proteínas en hemolinfa ninguno de ellos está relacionado en proteínas de la hemolinfa pura y como ya se había mencionado con anterioridad las investigaciones están centradas en la concentración de proteínas comparado diversas dietas lo que al comparar los valores del camarón blanco suelen ser más altos con los obtenidos en este estudio debido al aumento proteico en sus dietas.

6.2 Electroforesis SDS-PAGE

El gel fue teñido con azul de Coomassie (BioRad, USA) permitiendo observar las bandas proteicas que están presentes en la hemolinfa de *Macrobrachium tenellum* tanto en vida silvestre como en cautiverio.

Para poder determinar el peso molecular de cada una de las proteínas se usó un marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standars, Kaleidoscope, BIORAD y se calculó la distancia de migración relativa (Rf), posteriormente se

obtuvieron los pesos moleculares de cada una de las bandas (Figura 6.1), el cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$RF = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

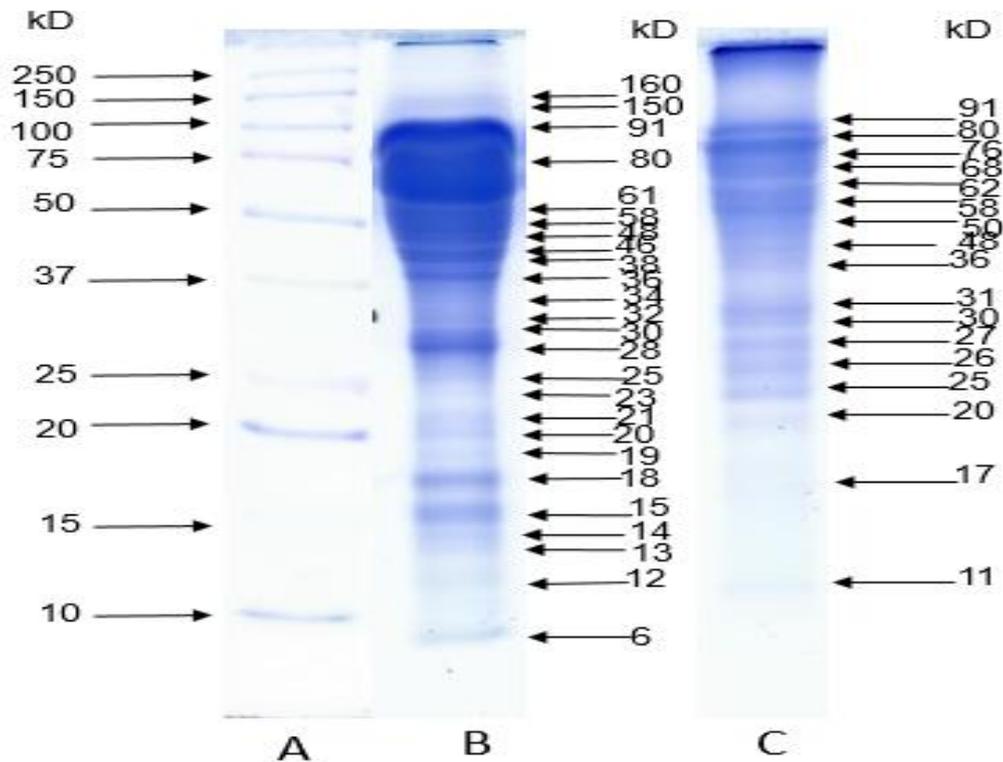


Figura 6. 1 Perfil electroforético de organismos de vida silvestre y en condiciones de cautiverio. **A.** Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope, BIORAD **B.** Bandas proteicas presentes en la hemolinfa de *M. tenellum* de vida silvestre con sus respectivos pesos moleculares **C.** Bandas proteicas presentes en la hemolinfa de *M. tenellum* en condiciones de cautiverio con sus pesos moleculares.

En el perfil electroforético de organismos de vida silvestre (Figura 6.1B) entre las bandas proteicas identificadas, se encuentran bandas de mayor peso molecular de 160, 150, 91 y 80 kDa. Las proteínas de mediano peso molecular se encuentran en el rango de los 61, 37 y 21 kDa y por ultimo las proteínas de menor peso molecular

se encuentran entre 20,15, 10 y 6 kDa, estas bandas varían en su expresión de acuerdo a la concentración de proteína.

En el perfil electroforético de organismos en cautiverio se puede observar bandas proteicas de mayor peso molecular que van de 91 a 76 kDa, las bandas de mediano peso molecular se encuentran entre 68,58 y 36 kDa, y las bandas de menor peso molecular son las que se encuentra entre los 31, 25 y 11 kDa.

Tanto en el perfil electroforético de la hemolinfa de organismos de vida silvestre y en cautiverio se puede observar que las bandas proteicas con un peso molecular de 91, 80, 58,48, 36, 25 y 20 kDa se encuentran presentes en ambos perfiles electroforéticos y el resto de las bandas proteicas varían en su expresión, también se puede encontrar la Hemocianina con un peso de 75 kDa que tiene como función transportar oxígeno, la unión de iones metálicos y la actividad oxidorreductasa, esta proteína han sido registrada para *Macrobrachium rosenbergii*, y *M. nipponense*, en esta especie se reportó que la Hemocianina constituye el 65% de las proteínas de la hemolinfa.

Cota (2007) en un análisis electroforético SDS-PAGE relacionado a dos subunidades de la hemocianina, concluyo que en el camarón *P. vannamei* el peso molecular de la hemocianina se encuentra entre 75 y 73 kDa dato que coincide con Figueroa *et al.*, (1997) y en este estudio también se obtuvo que el peso molecular de dicha proteína fue de 75 kDa. En la especie *Panulirus interruptus* se obtuvo el peso molecular para la subunidad a, b y c, siendo de 94 kDa, 90 kDa y 80 kDa respectivamente, estas subunidades difieren por el tipo de glicosilacion y el porcentaje de carbohidratos.

6.3 Cuantificación de metabolitos

Se cuantificaron los metabolitos en plasma y hemolinfa en el primer día de congelación y en organismos de vida silvestre se identificó que el nivel de glucosa en plasma es de 44.901 mg/dl y en hemolinfa de 49.438 mg/dl, en el plasma el nivel de colesterol fue de 98.690 mg/dl y en hemolinfa de 63.799 mg/dl y en el plasma el

nivel de triglicéridos fue de 87.784 mg/dl, en hemolinfa fue de 97.882 mg/dl (Tabla 6.5). Los valores de estos metabolitos corresponden al promedio de 9 muestras para plasma y 11 muestras para hemolinfa.

Tabla 6. 5 Niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma y hemolinfa de *M. tenellum* de vida silvestre.

METABOLITO	PLASMA		HEMOLINFA	
	mg/dl	ES	mg/dl	ES
Glucosa	44.901	± 11.333	49.438	± 7.160
Colesterol	98.690	± 10.017	63.799	± 6.85
Triglicéridos	87.784	± 11.653	97.882	± 7.738

Los valores de metabolitos de organismos en cautiverio corresponden al promedio de 11 muestras, se obtuvo los niveles de glucosa que fueron de 46.284 mg/dl en plasma y 47.213 para hemolinfa, en plasma los niveles de colesterol fueron de 66.809 mg/dl y de 78.299 mg/dl en hemolinfa, y los niveles de triglicéridos fueron de 92.680 mg/dl en plasma y en hemolinfa fue de 96.097 mg/dl (Tabla 6.6).

Tabla 6. 6 Niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma y hemolinfa de *M. tenellum* en cautiverio.

METABOLITO	PLASMA		HEMOLINFA	
	mg/dl	ES	mg/dl	ES
Glucosa	46.284	± 6.069	47.213	± 8.1
Colesterol	66.809	± 4.130	78.299	± 7.706
Triglicéridos	92.680	± 8.293	96.097	± 16.446

Las niveles de glucosa tanto para organismos de vida silvestre como cultivados son similares pero los niveles de triglicéridos y colesterol presentan diferencia, el nivel de colesterol en el plasma de organismos de vida silvestre es más alto a comparación con los organismos cultivados y el nivel de colesterol en hemolinfa de organismos de vida silvestre es más bajo comparado con los organismos cultivados y en el caso de triglicéridos el nivel es más bajo en plasma de organismos de vida silvestre, esto quizás se pueda deber a la diferente dieta que llevan estos

organismos en sus condiciones de vida ya que en vida silvestre suelen ser omnívoros y detritívoros y en cautiverio son alimentados con camarón factor que puede afectar estos niveles.

Pascual *et al* (2003a) analizaron en el camarón blanco *Litopenaeus vannamei*, los niveles de glucosa y colesterol en plasma con diferentes niveles de congelación y reportaron un nivel de glucosa de 26.1 mg/ dl y en colesterol de 37 mg/dl en primer día de congelación y de 26.4 mg/ml y de 42 mg/ml en el tercer día de congelación, donde determinaron que se debe de realizar las evaluaciones dentro de las 36 horas, ya que se observó que los tiempos de congelación afecta los niveles de los metabolitos, y en esta investigación se observó que en *M. tenellum* los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en plasma suelen bajar al tercer día de congelación.

Se debe menciona que en el camarón *L. vannamei* también se ha medido los niveles de los metabolitos en hemolinfa comparando distintas dietas en organismos de condiciones de laboratorio y estanques los niveles de glucosa que obtuvieron fue de $0.28 + 0.18$ mg/ml y $0.38 + 0.21$ en organismos de laboratorio y estanque respectivamente, en colesterol se obtuvo 1.06 ± 0.52 mg/ml en los animales mantenidos en estanques y 0.44 ± 0.21 mg/ml en animales de laboratorio, los niveles de metabolitos obtenidos en el camarón blanco están por debajo a los obtenidos a esta investigación esta diferencia en los niveles de metabolitos entre organismos de diferente estilo de vida se debe al tipo de dieta con el que fueron sometidos y a pesar que diversos trabajos relacionados coinciden con los niveles en el camarón blanco para *M. tenellum* aún no se ha reportado un parámetro de metabolitos sanguíneos que sean comparables.

6.4 Análisis proteómico

Mediante el análisis proteómico se identificaron 373 proteínas existentes en la base de datos (UniProt e Interprot), en donde se analizaron y dividieron de acuerdo a los mecanismos de defensa que participan.

6.4.1. Exoesqueleto

Se dividieron las proteínas de acuerdo al mecanismo de defensa que participan; se encontró la proteína quinasa que está presente en el exoesqueleto del langostino región que es la primera línea de defensa, también se encontró obstructor B, obstructor E1, obstructor E2, la proteína cortical y Peritrofan proteínas que representan una entrada de unión a Quitina, se analizó la proteína Lipocaina tipo crustacianina que es la que se encarga de darle color a los crustáceos, esta proteína fue reportada en el langostino *M. rosenberguii* en donde las carotenoproteínas que se encuentra en la capa externa calcificada del caparazón y actúa como el pigmento dominante de la concha de langosta, dando lugar a su característico color azul. Y por último se analizó una proteína similar a la cutícula, esta proteína cuticular suele ser específica para el tipo de cutícula o exoesqueleto ya sea flexible o rígida que se produce en la etapa de desarrollo de los crustáceos.

6.4.2 Hemolinfa

En la hemolinfa se describieron 14 proteínas y sus pesos moleculares, las cuales muestran en la tabla 6.7. Debido a que los crustáceos poseen un sistema de circulación abierto las hormonas, células, oxígeno y nutrientes se encuentran libres en la hemolinfa (Vazquez *et al.*, 2009). La hemolinfa es el líquido tisular que se encuentra en el sistema circulatorio de los crustáceos y ocupa todo el interior de su cuerpo rodeando todas las células, diversas investigaciones han reportado que en la hemolinfa de invertebrados se puede encontrar la presencia de materiales aglutinantes y su actividad biológica es parecida a los anticuerpos de los vertebrados (Fredric y Ravichandran 2012).

Tabla 6. 7 Proteínas descritas en la hemolinfa de *M. tenellum*

Mecanismo de defensa	Proteína	Peso molecular kDa
Hemolinfa	Hemocianina	75
	Corazonina	--
	Lipopolisacaridos	7.2
	Proteina de unión a beta-1,3-glucanos	150
	Quitina sintasa,	--
	Quitinasa 3	54
	Quitinasa 3A	54
	Quitinasa 3B	54
	Quitinasa 1B	35
	Quitinasa 1A	35
	Quitinasa 4	68
	Quitinasa 3C	54
	Quitinasa 1C	35
	Lizosima	17

Dentro de este análisis se encontró Hemocianina, esta proteína presenta un peso molecular de 75 kDa y es incolora, pero se vuelve de color azul cuando se oxigena (Fredric y Ravichandran 2012). La hemocianina ha sido reportada en la especie *M. nipponense* y está encargada del transporte de oxígeno, la unión de iones metálicos y la actividad oxidorreductasa. Recientemente se ha demostrado que la Hemocianina tiene actividad fenoloxidasa y es activada por proteólisis, también tiene la capacidad de almacenar proteínas, transportar ecdisona (hormona de la muda) y como precursora de péptidos antifúngicos.

Se encontró en la hemolinfa Corazonina que es un péptido cardioactivo y está involucrado en la regulación fisiológica de los latidos del corazón en la regulación fisiológica de los latidos del corazón. Veenestra (1989) menciona que este péptido fue descrito por primera vez en la cucaracha *Periplaneta americana* y fue cuando se demostró que se encarga de aumentar el ritmo cardiaco en los artrópodos, también se ha demostrado que en *L. migratoria* y *S. gregaria* el albinismo está relacionado a mutaciones de la regulación de este péptido (Sugara *et al.*, 2017).

También se encontró Lipopolisacaridos y proteína de unión a beta-1,3-glucanos, el primero se encuentra en las paredes de las bacterias Gram negativas y los beta-1,3-glucanos se encuentran en las paredes celulares de levaduras, algas y hongos; en los crustáceos existen dos tipos de proteínas que se encargan de reconocer y de unir a los β -glucanos; la primera clase está constituida por una lipoproteína de alta densidad, la proteína de unión a β -glucanos (β GBP) sintetizada en el hepatopáncreas y hemolinfa (Romo-Figueroa *et al.*, 2004), la segunda clase está compuesta por pequeñas proteínas, como la GBP (del inglés, β -glucan binding proteins) y la LGBP (del inglés, masquerade-like protein) (Cheng *et al.* 2005; Du *et al.*, 2007), que se sintetizan en el hepatopáncreas y los hemocitos de los crustáceos.

La proteína de unión a β -glucanos (β GBP) ha sido caracterizada y aislada en las langostas de agua dulce *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus astacus* y *P. clarkii*, en el cangrejo *C. maenas* y en los camarones *Farfantepenaeus californiensis* y *L. vannamei* (Romo Figueroa *et al.*, 2004). En el camarón *Penaeus monodon* se identificó una proteína de 39,5 kDa que se une a los β -1,3-glucanos presentes en zymosan y curdlan (polisacárido producido por bacterias y un homopolímero de glucosa con enlace β -1,3-glucosídico), pero esta proteína no se une a los lipopolisacaridos (LPS) bacterianos, lo que demuestra que tiene un reconocimiento específico para los hongos.

Por último, se encontró quitina sintasa, quitinasa 3, 3A, 3B, 1B,1A,4,3C,1C que ha sido reportada en *M. nipponense*, se localizan en la pared celular de los hongos y posteriormente se activan en el hospedero. La lisozima hidroliza los enlaces beta-1,4 entre la N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-acetil-murámico y en el peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas, ayudando así a combatir las bacterias invasoras.

Una vez que los patógenos han atravesado esta primera línea de defensa, entonces, los hemocitos activan las respuestas celulares de fagocitosis,

nodulación, coagulación, mecanización y encapsulación, estos mecanismos sirven para controlar y eliminar patógenos.

6.4.3 Encapsulación

Se identificó la proteína Peroxinectina la cual usa peróxido de hidrogeno como receptor de electrones para catalizar una serie de reacciones oxidativas y es la que estimula a los hemocitos granulares para que inicie el proceso de encapsulación, actualmente no hay investigaciones que describan con mayor profundidad a esta proteína (Taurong, 1999).

6.4.4 Coagulación

Se identificó la enzima transglutaminasas que es responsable de catalizar la reacción de transferencia entre los grupos carboximino de los restos de glutamina en proteínas, péptidos y una variedad de aminas primarias. Esta enzima del sistema de coagulación se encuentra en crustáceos en el interior de las células hialinas y se libera al plasma por daño tisular o como respuesta de los hemocitos a la presencia de β -1-3- glucanos y LPS en las paredes celulares de hongos y bacterias. (Satchwell *et al.*, 2009).

6.4.5 Fagocitosis

La alfa2-macrobulina tiene actividad inhibidora de la endopeptidasa y en una infección viral o fúngica se liberan hemocitos granulares que participan en la activación de la fagocitosis, ha sido reportada en *M.nipponense* y *M. rosenberguii* (Vandooren y Itoh, 2021). Las proteínas Rab7A, Rab18, Rab9A y Rab 27A participan en la endocitosis y exocitosis, estas son utilizadas por virus para infectar mediante endocitosis las células del hospedero, han sido reportadas en *M. malcolmsoni*, *M. nipponense* y *M. rosenbergii* (Paduch *et al.*, 2001).

El proceso de fagocitosis va acompañado de la explosión respiratoria, se identificaron las siguientes proteínas relacionadas a este proceso, superóxido

dismutasa, la superóxido dismutasa de cobre/zinc (SODC) y superóxido dismutasa de manganeso citosólico, catalizan la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, lo que proporciona una gran protección antioxidante para la mayoría de las células expuestas al oxígeno y han sido reportadas en *M. rosenberguii*. Dependiendo del ion metálico que contienen las superóxido dismutasas se han clasificado en tres grupos principales: La Mn-SOD se encuentra en las mitocondrias, la Fe-SOD en bacterias, y la Cu/Zn-SOD se encuentra en eucariotas. La Cu/Zn-SOD se subdivide en SOD extracelular y SOD citosólica. La SOD extracelular (EC-SOD) actúa en la destrucción de parásitos ingeridos o encapsulados durante la explosión respiratoria producida por la fagocitosis (Homblad y Söderhäll, 1999).

6.4.6 proPO

En el sistema proPO se encontró la proteína profenoloxidasa, esta proteína activa el sistema proPO, también tiene diversas funciones como la oxidación de o-difenoles a o-quinoles y la hidroxilación de monofenoles, está involucrada en la formación de pigmentos como las melaninas dando paso al proceso de melanización que también es otro mecanismo de defensa (Kobayashi *et al.*, 1994).

6.4.7 Lectinas

Dentro de las lectinas analizadas están la lectina tipo C y la lectina tipo L; la lectina tipo C ha sido reportada en la especie *M. nipponense* y son proteínas o glicoproteínas cuyo reconocimiento está basado a carbohidratos dependiente de Ca²⁺, se piensa que participan en fagocitosis adhesión celular, endocitosis y fijación complementaria (Marques y Barroco, 2000); estas lectinas se clasifican en dos grupos según su función: las que reconocen ligandos endógenos y las que reconocen ligandos exógenos y las lectinas tipo L pueden interactuar con N-glicanos de glicoproteínas y puede unir glicanos muy grandes de manosa unidos a glicoproteínas en el retículo endoplásmico (Broom, 2012). Alfa-1,2- manosidasa y alfa-amilasa se encargan del proceso metabólico de carbohidratos, estas enzimas catalizan la transferencia de partes de azúcar de moléculas donantes activadas a

moléculasceptoras específicas, formando enlaces glicosídicos (Campbell *et al.*, 1997; Davies y Henrissat, 1999).

6.4.8 Vías de señalización

Dentro de las proteínas que participan en las vías de señalización se encuentra la proteína Pellino está involucrada en el proceso de señalización de tipo Toll (TLR). Las proteínas Toll o receptores tipo Toll (TLR) como Toll receptor 1, Toll receptor 2 y Toll 3, están involucrados en la inmunidad innata antibacteriana y antifúngica en invertebrados, se ha reportado la expresión de estos receptores Toll en hemocitos, branquia, cerebro, corazón, estómago, intestino y músculo, pero también se han reportado distintos receptores de tipo Toll en los crustáceos *Penaeus monodon*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Marsopenaeus japonicus* y *L. vannamei* y *M. rosenbergii* (Arts *et al.*, 2007; Mekata *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012); la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide MyD88 y Factor 6 asociado al receptor de necrosis tumoral (TNF) contienen un dominio TIR (toll/receptor de interleucina-1) y un dominio de muerte, el dominio TIR es importante para la interacción de la proteína con los receptores, mientras que el dominio de muerte está involucrado en la transducción de señales (Yang *et al.*, 2008) y finalmente la proteína Quinasa 4 está relacionada al receptor de interleucina 1 que es una inmunodeficiencia ligada a una mayor susceptibilidad a las infecciones invasivas causadas por bacterias piógenas.

VII. CONCLUSIONES

Las concentraciones de proteína promedio es similar en las dos diferentes condiciones de vida siendo de 1.489 mg/ml para organismos de vida silvestre y de 1.141 mg/ml para los organismos en provenientes de cautiverio, por lo que en ambas condiciones se encuentran presentes las mismas proteínas.

Las bandas proteicas son similares en ambas condiciones de vida, siendo la Hemocianina con un peso de 75 kDa con mayor importancia en el mecanismo de defensa de *M. tenellum*.

Los niveles de los metabolitos presentaron una diferencia entre las dos condiciones de vida y los niveles de metabolitos en plasma fueron más altos en comparación con los niveles que han reportado en el camarón blanco.

Los diferentes niveles de congelación mostraron que los niveles de metabolitos suelen ser afectados por lo que es recomendable que las muestras sean manejadas por igual antes de ser evaluadas en un rango no mayor de 36 horas de congelación.

Se analizaron 373 proteínas que participan en diferentes procesos biológico y funciones moleculares siendo los más representativos procesos de fagocitosis, reconocimiento y señalización y el exoesqueleto que es la primera línea de defensa.

VIII. REFERENCIA

- Arts, J. A. J., Cornelissen, J., Cijssouw, T., Hermsen, T., Savelkoul, H. F. J. 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immun.* 23(3):504–513.
- Berger C. 2000. Aportes de la biotecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. Avances en nutrición acuícola. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Asociación Langostina Peruana (ALPE) pp. 102-110.
- Broom A., Doxey A.C., Lobsanov Y.D., Berthin L.G., Rose D.R., Howell P.L., McConkey B.J., Meiering E.M. 2012 Modular Evolution and the Origins of Symmetry: Reconstruction of a Three-Fold Symmetric Globular Protein, *Structure.* 20 161–171.
- Rendon L. y Balcazar, J. L. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Naturales. Guayaquil. Ecuador. *Revista AquaTIC*, no 19, pp. 27-33.
- Campbell J. A., Davies G. J., Bulone V y Henrissat B. 1997. clasificación de nucleótidos-difosfo-azúcar glicosiltransferasas basada en similitudes de secuencia de aminoácidos. *Bioquímica. J.* 326 (Pt 3), 929-39.
- Cárcamo-Aréchiga N., Grijalva-Chon, J. M., Hernández-López, J., Varela-Romero, A., López-Torres, A. y Medina-Juárez, L.A. 2016. Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infectivo: una revisión. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud.* (1): 32-42.
- Aliko V, Hajdaraj G, Caci A, Faggio C. 2015. Copper-induced lysosomal membrane destabilisation in haemolymph cells of mediterranean green crab (*Carcinus aestuarii*, Nardo, 1847) from the Narta Lagoon (Albania). *Braz Arch Biol Technol* 58: 750–756.
- Aparicio-Simon B., Piñon M., Racotta R., Racotta I. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exponses to acute handling stress. *Aquaculture*, 298:308-314.
- Arroyo-Renteria, G. y Magaña-Ríos, L. 2001. Contribución al conocimiento de las especies de *Macrobrachium* y *Atya* con especial referencia a los langostinos en el cauce del río Baluarte (1991). Tesis de Licenciatura en Biología Pesquera, Universidad Anáhuac México Sur, Ciudad de México. pp 58
- Arzola-González, J. F. y Flores-Campaña, L. M. 2008. Alternativas para el aprovechamiento de los crustáceos decápodos del estero El Verde Camacho, Sinaloa, México. *Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo.* 24(1): 41-48.
- Aydin S. N.; Gutelpendand, H. Y. 200. Natural and Experimental infections of *Campylobacter cryaerophila* in rainbow trout, gross pathology, bacteriology, clinical pathology and chemotherapy. *Fish pathology*, v.35, n.3, p. 117-123.
- Bachère E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-11.

- Battistella S., Bonivento, P. y Amirante, G. A. 1996. Hemocytes and immunological reactions in crustaceans. *Italian Journal of Zoology*. 63: 337-343
- Blum M, Chang H, Chuguransky S, Grego T, Kandasaamy S, Mitchell A, Nuka G, Paysan-Lafosse T, Qureshi M, Raj S, Richardson L, Salazar GA, Williams L, Bork P, Bridge A, Gough J, Haft DH, Letunic I, Marchler-Bauer A, Mi H, Natale DA, Necci M, Orengo CA, Pandurangan AP, Rivoire C, Sigrist CJA, Sillitoe I, Thanki N, Thomas PD, Tosatto SCE, Wu CH, Bateman A y Finn RD. La base de datos de familias y dominios de proteínas InterPro: 20 años después. *Investigación de ácidos nucleicos*, noviembre de 2020, (doi: 10.1093/nar/gkaa977). www.ebi.ac.uk/interpro/
- Bray W.A., Lawrence, A.L., Lester, L.J. 1990. Reproduction of eyestalk-ablated *Penaeus stylirostris* fed various level of total dietary lipids. *J. World Aquacult. Soc.* 21:41-52.
- Buckup L., Dutra B.K., Ribarcki, F.P. Fernandes F.A., Noro C.K., Oliveira G.T., Vinagre A.S. 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149:59-67.
- Butcher PA, Leland JC, Broadhurst MK, Paterson BD, Mayer DG. 2012. Giant mud crab (*Scylla serrata*): relative efficiencies of common baited traps and impacts on discards. *ICES J Mar Sci* 69: 1511–1522.
- Calderon J. V. 2001. VI Congreso Ecuatoriano de Acuicultura. Libro de Resúmenes.
- Camacho-Jiménez L., Sánchez-Castrejón, E., Díaz, F., Aguilar, M.B., Muñoz-Márquez, M.A., Ponce-Rivas, E. 2017. Cloning and expression of the recombinant crustacean hyperglycemic hormone isoform B2 (rCHH-B2) and its effects on the metabolism and osmoregulation of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *General and Comparative Endocrinology*, 253(1) 33–43.
- Cárcamom-Aréchiga, N., Grijalva, Ch. J. M., Hernández, J., Varela, R. A., López, T, A., y Medina, J. L. A. 2016. Mecanismos de defensa de los camarones peneidos durante un proceso infectivo: una revisión. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* 1:32-42.
- Centeno L., Silva-Acuña R., Barrios R., Salazar-Lugo R., Matute C, Pérez J. 2007. Características hematológicas de la cachama (*Colossoma macropomum*) en tres etapas de crecimiento cultivadas en el estado Delta Amacuro. *Zootecnia Trop.* 5(4):237-243.
- Chen J.C., Chen C.T., Chen S.Y. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid level in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed at different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 110:85-94.
- Cheng W., Liu, C. H., Tsai, C. H., Chen, J. C. 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and β -

- 1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 18: 297-310.
- Ching C. A. 2005. Los hemocitos, células de defensa contra las enfermedades del camarón marino. *Boletín NICOVITA. Camarón de mar. Volumen 10 Edición 1 Enero – Marzo*.
- Cota R. K. A. 2007. Caracterización enzimática de la actividad de fenoloxidasa de la hemocianina de *Penaeus vannamei*. Tesis Maestría. Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C. pp 20- 35.
- Davies G y Henrissat B. 1999. Estructuras y mecanismos de las glicosil hidrolasas. *Estructura* 3, 853-9.
- D'Abramo L.R., Conklin, D.E. 1995. New developments in the understanding of the nutrition of penaeid and caridena species of shrimps. En *Proceedings of the Special Session on Shrimp. Aquaculture 95. World. Aquacult. Soc. Baton Rouge, Louisiana. USA. 95-107*.
- Destoumieux D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J. y Bachère, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*. 272: 28398–28406.
- Destoumieux D., Bulet, P., Strub, J. M., Van Dorsselaer A. y Bachere, E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem*. 266: 335–346
- Destoumieux D., M. Muñoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps y E. Bachère (2000) Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J. Cell Science*, 113:461-469.
- Du X. J., Zhao, X. F., Wang, J. X. 2007. Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Molecular Immunology*, 44: 1085-1094.
- Espino-Barr E., García, B. A., Puente, G. M., Zamorano, A. C., Ahumada A. O. & Cabral-Solís, E. 2006. Análisis preliminar de los aspectos biológicos del langostino mazacate *Macrobrachium tenellum*, en el estado de Colima. Presentación en cartel. In: B.E. Espino, A.M. Carrasco & G.M. Puente (eds.). *Memorias del III Foro Científico de Pesca Ribereña. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras de Manzanillo, Instituto Nacional de la Pesca, SAGARPA. Jalisco, pp 93-94*.
- Espinosa, G., T. Rodríguez, J. Marrero, L. Ramos, Y. Borrell, U. Bécquer, F. Nodas y N. Hernández (2002) Efectores inmunitarios como herramientas en la prevención de enfermedades en el camarón blanco *Litopenaeus schmitti*. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 765- 777.
- Espinoza L. M.W. 2006. Efecto del silicio orgánico sobre la respuesta inmune del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. pp 25.
- Fagutao F.F., Kondo, H., Aoki, T. y Hirono. I. 2011. Prophenoloxidase has a role in innate immunity in penaeid shrimp. En: *Diseases in Asian Aquaculture VII*. M.G. Bondad-Reantaso, J.B. Jones, F. Corsin y T. Aoki (eds.), pp. 171-176. Asian Fisheries Society, Selangor, Malaysia.

- Figeroa C., Calderon de la Barca A. M., Vazquez L., Higuera I., Yepiz G. 1997. Purification of hemocyanin from White shrimp (*Peneaeus vannamei*) by immobilized metal affinity chromatography. *Comp Biochem PhysiolB*. 117(2), 203-208.
- Fredric K W., Ravichandran, S. 2012. Proteínas hemolinfáticas en crustáceos marinos. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2(6):496-502.
- Fonseca M. E., Gonzáles, S. R. y Rico, G. R. 2013. Sistema inmune de los camarones. *Revista Aqua TIC* no 38. pp. 68-84.
- Garrido P.A., Teijón, R.J.M., Blanco, G.D., Villaverde, G.C., Mendoza, O.C., Ramírez, R.J., 2005. *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. E. Alfaomega. México. 384.
- Guillén, M.V.L.2009. Estructura y propiedades de las proteínas. *Ingeniería Biomédica*. Universidad de Valencia. España. p. 31.
- Guzmán A. M., Rojas, G. J. L. y González, G. L. D. 1981. Ciclo anual de maduración y reproducción del "Chacal" *Macrobrachium tenellum* y su relación con factores ambientales en las lagunas costeras de Mitla y Tres Palos, Guerrero, México (Decapoda: Palaemonidae). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*, 9(1): 67-80.
- Guzmán A. M. 1987. *Biología, ecología y pesca del langostino Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871), en lagunas costeras del estado de Guerrero, México. Tesis de Doctorado e.n Ciencias del Mar (Oceanografía Biológica y Pesquera), Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Autónoma Nacional de México. D.F., México. 319 pp
- Goodyear R., Martínez, V. & Del Rosario, J. B. 1976. Moluscos y crustáceos decápodos del Rio Chiriquí (1976). Universidad de Panamá. In: *Biota de Panamá*. 2008.
- Hrubec T.C.; Cardinale, J.L.; Smith, S.A. 2000. Hematology and Plasma Chemistry Reference Intervals for Cultured Tilapia (*Oreochromis Hybrid*). [En línea]. VirginiaMaryland, USA: Department of Biomedical Sciences and Patology, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, v.29, n,1. Disponible en: [http:// www. vetclinpathjournal.org/Vol.29/VCP2901_7-12. pdf](http://www.vetclinpathjournal.org/Vol.29/VCP2901_7-12.pdf).
- Iwanaga, S., & Lee, B. L. (2005). Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *BMB Reports*, 38(2), 128-150.
- Jayachandran K. V. 2001. Palaemonid prawns: biodiversity, taxonomy, biology and management. Editions Science Publishers, Enfield. pp 192.
- Jiménez F. (1999). Atlas de enfermedades 34 de peneidos. SEMARNAP. México. 81.
- Johansson M., Keyser, P., Sritunyalucksana, K. y Söderhäll, K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191: 45-52.
- Johansson M. y Söderhäll, K. 1989. Cellular Immunity in Crustaceans and the proPO System. Reprinted from *Parasitology Today*. 5(6): 171-176 11.

- Johson P. T. 1987. A review of fixed phagocytic y pinocytotic cell of decapods crustaceans, whit remarks on hemocytes. *Development and Comparative Immunology* 11: 679-704.
- Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jiménez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borrón JC, Hearing. 1994. La proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP1) funciona como una DHICA oxidasa en la biosíntesis de melanina. *VJ. EMBO J.* 13, 5818-25.
- Laxmilatha P. y Laxminarayana, A. 2004. Fine structure of the haemocytes of the Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837). *Crustaceana.* 77: 835-848.
- Lehninger A.L. 1989. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* 2ª edición. Omega. Barcelona España. 117 p.
- Levashina E. A, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC. Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell.* 2001; 104:709–718. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00267-7.
- Lee, S., y Söderhäll, K. 2001. Characterization of a pattern recognition protein, a masquerade-like protein, in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Immunol* 166: 7319–7326.
- Lu Y, Wang F, Li L, Dong S (2016) Responses of metabolism and haemolymph ions of swimming crab *Portunus trituberculatus* to thermal stresses: a comparative study between air and water. *Aquac Res* 47: 2989–3000.
- Martínez C.L.R. 1999. *Cultivo de camarones peneidos: Principios y prácticas.* Edit. Editor. 283 p.
- Martinez F. S. 2007. Sistema inmune en camarones. Asistencia Técnica Nicovita-ALICORP SAA. Boletín NICOVITA. Julioseptiembre. Edición Tumpis.
- Marques M. R. F. y Barracco M. A. Lectins as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 2000; 191: 23–44.
- Mekata, T., Kono, T., Yoshida, T., Sakai, M., Itami, T. 2008. Identification of cDNA encoding Toll receptor, MjToll gene from kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immun.* 24(1):122–133.
- Mercier L., Palacios, E., Campa-Cordona, A., Tovar-Ramirez, D., Hernandez-Herrera, R., Racotta, I. 2008. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture*, 258:633-640.
- Mdezhitov, R., y Janeway, C. A. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* 173:89-97.
- Montaño-Perez K., Reyes-Izquierdo, T. y Vargas-Albores, F. 1999. El proceso de coagulación en camarones penaeidos. *Ciencia* 50:23-28.
- Nappi A. J., y Ottaviani, E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22, 469-480.

- Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. 2019 Innate and adaptive immune memory: An evolutionary continuum in the host's response to pathogens. *Cell Host & Microbe* 25(1): 13–26.
- New M. B. 2000. History and global status of freshwater prawn farming. In: New M.B. and Valenti W.C. (eds). *Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii*. Oxford, England. Blackwell Science. pp. 111.
- Newsholme F.A., Leech, A.R. 1983. *Bioquímica médica*. Interamericana, México. 804 p.
- Pascual C., Gaxiola, G. y Rosas, C. 2003a. Blood metabolites and hemocyanin of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: the effect of culture conditions and a comparison with other crustacean species. *Mar. Biol*, vol. 142, n°4, pp: 735-745.
- Pascual C., Sanchez A y Rosas C. Manual de métodos para la evaluación de componentes sanguíneos de camarones peneidos. 2003b. Laboratorio de Ecología y Biología Marina Experimental Fac. de Ciencias UNAM Cd. del Carmen, Campeche.
- Pascual C., Sanchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gabriela G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E., Rosas C. 2006. Biochemical physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*, *Aquaculture*. 251:2-4.416-429.
- Pascual P.F., Coloso, R.M., Tamse, C.T. 1983. Survival and some histological changes in *Penaeus monodon*, *fabricius* juveniles fed various carbohydrates, *Aquaculture* 31:169-180.
- Padhi, A., y Verghese, B. 2008. Detecting molecular adaptation at individual codons in the pattern recognition protein, lipopolysaccharide- and b-1,3-glucan-binding protein of decapods. *Fish Shellfish Immunol* 24: 638–648.
- Paduch M, Jelen F y Otlewski J. 2001. Estructura de las proteínas G pequeñas y sus reguladores. . *Acta Biochim. Pol.* 48, 829-50.
- Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Perera, E., Pardo-Ruiz, Z. y AlonsoJiménez, E. 2007. Phenoloxidase activity in the hemolymph of the spiny lobster *Panulirus argus*. *Fish y Shellfish Immunology* 23(6): 1187-1195.
- Ponce-Palafox J.T., Arana-Magallon, F.C., Cabanillas-Beltrán, H. y Esparza, H. 2002. Bases biológicas y técnicas para el cultivo de los camarones de agua dulce nativos del Pacífico americano *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871) y *M. americanum* (Bate, 1968). I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. pp. 534-546.
- Raa J. 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. *Reviews in Fisheries Science*, 4(3):229-288.
- Racotta I.S., Hernandez-Herrera R. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.* 125:437-443

- Randall D., Burggren, W., French, K. 1998. Fisiología Animal. 4ª ed. Mc Graw Hill-Interamericana. 795 p.
- Roch P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172:125-145.
- Rodríguez J. 1996. Estado del arte de la investigación científica en inmunología de Penaeidos". En: Calderón J., F. Magallón, E. Andratta, R. Sánchez (Eds). La investigación científica en Penaeidos de Iberoamérica. San Pedro de Manglaralto-Ecuador. 37-45.
- Romo-Figueroa M. G., Vargas-Requena, C., Sotelo-Mundo, R. R., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I., Söderhäll, K.; Yépiz-Plascencia, G. 2004. Molecular cloning of a β -glucan patternrecognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 713-726.
- Rosas C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Brito, R., Chimal, M. E., Van, W. A., 2000. El metabolismo de los carbohidratos de *Litopenaeus setiferus*, *L. vannamei* y *L. stylirostris*. V Simp. Intr. Nutric. Acuic. 19-22 Nov. 2000, Mérida, Yuc. Méx.
- Satchwell T.J., Shoemark D. K., Sessions R. B y Toye A. M. 2009. *Células sanguíneas mol. Dis.* 42, 201-10.
- Sahoo P., Pillai, B. R., Mohanty, J., Kumari, J., Mohanty, S. y Mishra, B.K. 2007. Differential affinity of the natural haemagglutinin of *Macrobrachium rosenbergii* towards vertebrate erythrocytes: effect of sex, size and moult stage on haemagglutination titre. *Indian J Exp Biol*; 45: 1–5.
- Santos E. A., Maia-Nery, L. E., Keller, R. y Gonçalves, A. A. 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. *Physiological Zoology*, 70(4), 415-420.
- Sanchez A., Pascual, P., Sanchez A., Vargas-Albores, F., Le Moullac G., Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation; *Aquaculture*, 198:2,2001.13-28.
- Sierra C. C., Ganados, R. J. G. 2009. Los crustáceos y su mecanismo de defensa en la acuicultura. *Narraciones de la ciencia y la tecnología*. Pp 41-45.
- Silva-Catiglioni D., Oliveira G.T., Buckup L. 2010. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hipoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 156:436-444.
- Silveira-Coffigny R., Martínez-Pérez, M., Ascencio, C. F., 2005. Características morfológicas y histoquímicas de las células de la sangre periférica de *O. aureus* S. Cichlidae. *Revista electrónica de veterinaria REDVET*, v.VI, n.10

- Smith V. J. y Söderhäll, K. 1983. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell and tissue research*, 233:295-303.
- Sosa, H.V.A. 2012. Proteómica CINVESTAV –Zacatenco. Veracruz, México. p.64
- Söderhäll K. y Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. *Ann Rev of Fish Diseases*. 3-23.
- Sugahara R., Tanaka S., Jouraku A., Shiotsuki T. 2017. Two types of albino mutants in desert and migratory locusts are caused by gene defects in the same signaling pathway. *Gene*.
- Sugumaran M. 1996. Roles of insect cuticle in host defense reactions. In: Soderhall K. Sadaaki, I. Vasta, G. (Eds.), *New directions in Invertebrate Immunology*. SOS Publications, Fair Haven. Pp. 355-374.
- Taurog Alvin. 1999. Evolución molecular de la peroxidasa tiroidea. *Biochimie* 81, 557-62.
- Thrall M.A., Baker, D.C., Campbell, T.W., DeNicolla, D. Fettman, M.J., Lassen, E.D., Rebar, A., Weiser, G. 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, Pp 776.
- UniProt: la base de conocimiento universal de proteínas en 2021 Ácidos nucleicos Res. 49: D1 (2021) www.uniprot.org.
- Vandooren J y Itoh Y. 2021. Alfa-2-macroglobulina en inflamación, inmunidad e infecciones. *Immunol* 12, 803244.
- Vargas-Albores F., Higera-Ciapara, I., Jiménez-Vega, F., Hernández-Lopez, J., Gollas-Gálvan, G y Yepiz-Plascencia, G. 1996. Posibilidades de inmunoestimulación del camarón a través del alimento. *Avances de Nutrición Acuícola III. Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, México. Pp 433-440
- Vasta G. R., Quesenberry, M., Ahmed, H. y O'Leary N. C. 1999. Type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Dev Comp Immunol* 1999; 23: 401– 420.
- Veenestra A. J. 1989. Isolation an structure of corazin, a cardioactive peptide from the american cockroach. *Febs Letters*, 250(2):231-234.
- Vázquez L., Sierra, C., Juárez, S., Agundis, C., Zavala, A. y Zenteno E. 1998. Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *Interciencia*, 23(6): 344-348
- Vázquez L., Alpuche, J., Maldonado. G., Concepción, A., Pereyra-Morales, A. y Zenteno. E. 2009. Immunity mechanisms in crustaceans. *Review Innate Immunity*. 15 (3); 179-188.
- Wang G. Computational Peptidology, *Methods in Molecular Biology*. In: Zhou P, Huang J (eds). 2015. *Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides*. New York: Springer Science Business Media. p. 44-66.

- Wang, P. H., Liang, J. P., Gu, Z. H., Wan, D. H., Weng, S. P., Yu, X. Q., He., J. G. 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1–3) from *Litopenaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol.* 36(2):359–371.
- Yang, C., J. Zhang, F. Li, H. Ma, Q. Zhang, T. A. Priya, J. Xiang.2008. A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* responsive to *Vibrio anguillarum*infection. *Fish Shellfish Immun.* 24(5):564–574.

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

Latin American Journal of Aquatic Research, 49(2): 202-211, 2021
DOI: 10.3856/vol49-issue2-fulltext-2605



Research Article

External morphological stages and protein variations along with the embryonic development of the longarm river prawn *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871)

Marcelo U. García-Guerrero¹ , Dulce M. Mateos-Guerrero² 

Juan J. Alpuche-Osorno³  & Rodolfo B. De los Santos-Romero² 

¹Laboratorio de Acuicultura Experimental, CHIDIR- Oaxaca Instituto Politécnico Nacional
Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca, México

²Tecnológico Nacional de México - Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca, México

³Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Facultad de Medicina y Cirugía
Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, México

Corresponding author: Rodolfo Benigno de los Santos-Romero (rdelossr@hotmail.com)

ABSTRACT. A good understanding of a given species' embryology is important to settle the larval rearing bases when juveniles are required for culture purposes or conservation programs. Changes in embryonic morphology, protein concentration, and protein type occurring in prawn eggs were analyzed in the present work. Berried females of *Macrobrachium tenellum* were collected in the Colotepec River, Oaxaca, Mexico. The eggs were taken from the ovigerous mass and embryonic stages classified by their color. Morphological changes in the embryos allowed identifying six embryonic stages based on color, egg size, and morphological features. Determinations of the protein extract were executed in SDS-PAGE (electrophoresis in polyacrylamide gels) and, subsequently, proteomic analyses were also performed. Protein bands along embryonic development and their molecular weights are presented and commented.

Keywords: Palaemonidae; *Macrobrachium tenellum*; embryology; eggs; electrophoresis; ontogeny; proteomics

INTRODUCTION

In the last 40 years, a series of studies have been conducted to understand the basic biology of some Latin American *Macrobrachium* prawns (García-Guerrero et al. 2013) but not as much as those reported for some Asian species such as *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). Along the Pacific coast of Mexico, one of the most common species is *Macrobrachium tenellum* (Smith, 1871), distributed from Mexico to Peru, mostly in riverine basins connected to the sea. In Latin America, the first studies with *Macrobrachium* prawns were conducted with this species by Román-Contreras (1979), Guzmán et al. (1981), and Guzmán (1987), dealing with ecological and reproductive aspects, research that continues until now. However, information concerning the early stages of their life cycle is almost unknown, and few works

have contributed to understanding their embryonic and larval development (García-Guerrero 2010, García-Guerrero et al. 2013). A good understanding of embryology is important to set the basis for larval rearing since juveniles are required for culture or conservation programs. Vega-Villasante et al. (2012) mention that one of the main problems during the embryonic development of *M. tenellum* is caused by poor water quality, which affects development, hatching, and survival. Some previous works suggest that the amount and kind of lipids and proteins as egg components determine yolk quality and egg quality (García-Guerrero 2009, 2010, García-Guerrero & Hernández-Sandoval 2012, Soundarapandian et al. 2013). These latter works suggest a close relationship between the egg quality and the amount of proteins, lipids, and carbohydrates stored as nutrients in *Macrobrachium* eggs.

Corresponding editor: Jesús Ponce-Palafox



These cannot be changed:

- Any authorship information including author order, co-first and corresponding authorships.
- The content and order of the affiliations. None may be removed or added.

Please only ANNOTATE the proof. Do not edit the PDF. If multiple authors will review this PDF, please return one file containing all corrections.

Molecular signature of the ontogenic development of the prawn *Macrobrachium tenellum*

(01)

(02)

Dulce Mateos Guerrero^{1,2,*}, Margarito Martínez-Cruz¹, Eduardo Pérez-Campos¹, Marcelo García Guerrero³, Rodolfo de los Santos-Romero⁴, Carlos Solórzano Mata², Jose Luis Sanchez⁵, Mohamed Ali Pereyra Morales⁵, Agustín Lugo⁶, Anayetzin Torres-Rivera⁷ and Juan Alpuche^{2,*}

¹ IT Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, Mexico

² Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, Mexico

³ Laboratorio de Crustáceos Dulceacuicolas, CIIDIR-Oaxaca Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, Mexico

⁴ Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Tecnológico Nacional de México, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, Mexico

⁵ Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Ciudad de México, Mexico

⁶ CONACYT-Facultad de Medicina y Cirugía, Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca de Juárez, Oaxaca, Mexico

⁷ Tecnológico de Estudios Superiores de Huixquilucan, TecNM, Huixquilucan, Estado de México, Mexico

* These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

The prawn *Macrobrachium tenellum* shows aquaculture potential due to its well-defined reproductive cycle linked to female nutritional requirements. Significant changes occur in egg composition during the 16 to 17-day embryo development. Understanding the ontogenic proteins is crucial for developmental insights and controlled reproduction. We employed free-label quantitative proteomics to analyze egg peptides at the initial and final stages of wild females. Using the emPAI protocol and Proteome Discoverer 2.0, we identified 89 differentially expressed proteins in *M. tenellum* eggs. Of these, 27 were exclusive to early-stage development and three to late-stage. Abundant proteins included Vitellogenin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, histone 4, beta-actin, and hemocyanin. Gene Ontology analysis revealed 518 terms across molecular functions, biological processes, and cellular components using the GoRetriever tool of AgBase and the CateGORizer tool of the Animal Genome Research Program. Carbohydrate metabolism was significant in early-stage development, with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase being the second most abundant protein. Proteins involved in ATP synthesis and cytoplasmic proteins associated with catalytic and binding activities related to primary metabolism were also detected. Our study elucidates the role of Vitellogenin in lipid transport activity and its potential involvement in the juvenile hormone feedback pathway. This pathway includes farnesoic acid O-methyltransferase and juvenile hormone epoxide oxidase, regulating protein biosynthesis, molt cycles (including chitinase activity), and potentially influencing controlled reproduction. Our proteomic analysis provides insights into the molecular mechanisms driving

Submitted 28 July 2023
Accepted 3 October 2023
Published TBD

Corresponding author
Juan Alpuche,
jalpuche.fmc@uabjo.mx

Academic editor
María Ángeles Esteban

Additional Information and
Declarations can be found on
page 16

DOI 10.7717/peerj.16344

© Copyright
2023 Mateos Guerrero et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

How to cite this article Mateos Guerrero D, Martínez-Cruz M, Pérez-Campos E, García Guerrero M, de los Santos-Romero R, Solórzano Mata C, Sanchez JL, Pereyra Morales MA, Lugo A, Torres-Rivera A, Alpuche J. 2023. Molecular signature of the ontogenic development of the prawn *Macrobrachium tenellum*. PeerJ 11:e16344 DOI 10.7717/peerj.16344



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



CIB
Centro de Investigaciones
Biológicas
del Noroeste

La Paz Baja California Sur 17 de mayo de 2023

Asunto: Autorización de asistente de proyecto FC-2016-1 / 2930

**L.I. Francisco Daniel Hernández Pérez
Coordinador del Doctorado en Ciencias en
Desarrollo Regional y Tecnológico
Instituto Tecnológico de Oaxaca.
PRESENTE**

Por medio de la presente informo que el manuscrito intitulado: "Análisis proteómico del sistema inmune del langostino *Macrobrachium tenellum*" de los autores Mateos Guerrero Dulce María, Alpuche Osorno Juan José, Martínez Cruz Margarito, Pérez Campos Eduardo Lorenzo, García Montalvo Iván Antonio, Pérez Santiago Alma Dolores, ha sido aceptado para la publicación en el capítulo de la obra en proceso de edición intitulada "Avances y contribuciones científicas para la conservación de langostinos", un producto del proyecto CONACYT - FC 2016 /2930 "Rendimiento reproductivo de langostinos nativos *Macrobrachium americanum*, y *M. Tenellum*: Alta calidad larvaria en condiciones de cautiverio", bajo la responsabilidad técnica de quien suscribe.

Habiendo sido notificado agradezco la atención brindada y reciba un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Edilmar Cortés-Jacinto.
Investigador Titular C. - Editor
Responsable Técnico de Proyecto 2930

C.c.p.- Archivo



Aceptado en espera de ser publicado

CONGRESOS

Participación (oral) en el congreso: LATIN AMERICAN & CARIBBEAN AQUACULTURE 2019 San José Costa Rica, Noviembre 2019 Con el trabajo:

1. Factores involucrados en la activación y regulación en la fagocitosis en *Macrobrachium tenellum*
2. Proteomic meta-analysis of *Macrobrachium tenellum*



Participación (cártel) en el congreso: XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica, Merida Yucatán, Octubre 2022. Con el trabajo:

1. Proteomic profile of phagocytosis of shrimp *Macrobrachium tenellum*
2. Determination of Cardiometabolic Risk in Medical Students



Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.

65 años
1957-2022

SACRAMENTO NO. 413
COL. INSURGENTES SUR
DEL BENITO JUÁREZ
CP. 03100
CDMX
TEL. (55) 56225742
WWW.SMB.ORG.MX
FACEBOOK:
facebook.com/RedSMB

MESA DIRECTIVA 2021-2022

PRESENTA
Dra. Susana María Teresa Hernández Sotomayor

VICEPRESIDENTE
Dr. Agustín Guzmán Hernández

SECRETARÍA TÉCNICA
Dra. Bertha María Josefina González Pedraza

SUBSECRETARÍA TÉCNICA
Dra. María de Lourdes Olivé Correy

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Sebastián Arellano Lozano
Dr. Edmundo Celia Cosío
Dr. Guillermo Conzatti Barón
Dr. Joaquín Cordero
Dr. Carlos del Río Estrella
Dr. Silvestre Frenk Frenk
Dr. María Claudia Hernández
Dr. Jesús Guzmán García
Dr. Jesús Kumán Rodríguez
Dr. José Laguarda García
Dr. Guillermo Mancera Padilla
Dr. Nani Ochoaiz Valera
Dr. Rafael D. Pardo Castro
Dr. Guillermo Salazar Álvarez

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Dulce María Mateos Guerrero

Quien asistió y presentó el trabajo:

Proteomic profile of phagocytosis of shrimp *Macrobrachium tenellum*

Por: Dulce María Mateos Guerrero, Margarito Martínez Cruz,
Rodolfo de los Santos, Edilmar Cortés, Juan José Alpuche Osorno

En la modalidad de cartel durante el
XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica
16 - 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Teresa Hernández Sotomayor
Presidenta





Sociedad Mexicana de
Bioquímica A.C.

65
años
1957-2022

SACRAMENTO NO. 413
COL. INSURGENTES BORJA
DEL. BENITO JUÁREZ
CP. 20100
COMX
TEL. (55)56225742
WWW.SMB.ORG.MX
FACEBOOK:
facebook.com/RaeSMB

MESA DIRECTIVA 2021-2023

PRESIDENTA

Dra. Subeida María Teresa Hernández
Sotomayor

VICEPRESIDENTE

Dr. Agustín Guerrero Hernández

SECRETARÍA TERCERÍA

Dra. Bertha María Jocelina González Pedraza

SECRETARÍA TERCERÍA

Dra. María de Lourdes Grand Conry

SECCIONES FUNDADORAS

Dr. Sebastián Arreguín Luján
Dr. Edmundo Caba Cuadilla
Dr. Guillermo Carragá Sánchez
Dr. Joaquín Castro
Dr. Carlos del Río Salgado
Dr. Silvestre Frías Pineda
Dr. Stella García Hernández
Dr. Jesús Guzmán García
Dr. Jesús Korte Rodríguez
Dr. José Leguía García
Dr. Guillermo Moreno Figueroa
Dr. Raúl Osorio Velasco
Dr. Elvira G. Pardo Castro
Dr. Guillermo Salazar Arreola

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Gladys Aurora Pulido García

Quien asistió y presentó el trabajo:

Determination of Cardiometabolic Risk in Medical Students

Por: Gladys Aurora Pulido García, Gladys Aurora Pulido,
Luz María Quirino-Vela, Dulce María Mateos-Guerrero,
Elizabeth Cruz-Altamirano, Juan José Alpuche-Osorno,
Yobana Pérez-Cervera

En la modalidad de cartel durante el
XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica
16 - 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Teresa Hernández Sotomayor
Presidenta



OTRAS PARTICIPACIONES

Curso de Inmunología, Facultad de Medicina y Cirugía UABJO. Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO. Duración 20 horas. 27,28 de Febrero y 01 de Marzo de 2019.



Congreso aniversario del "Centro de investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO". Facultad de Medicina y Cirugía UABJO. 14 y 15 de Agosto de 2019.



Curso teórico-práctico “Principios básicos para la purificación de proteínas”. Facultad de Medicina y Cirugía UABJO. Centro de Investigación Facultad de Medicina UNAM-UABJO. 13 y 14 de Noviembre de 2019.



Seminario: “Iniciativas para el desarrollo del sector Agroalimentario y Agroindustrial en el Istmo de Tehuantepec”. Duración de 20 horas, 26-29 de Octubre de 2021.



Tallerista en la “1era feria vocacional científica y tecnológica”, en el COBAO plantel 65 “San Pedro Martir”. 02 de Diciembre de 2022.



Tallerista en el programa de integración temprana de jóvenes a las humanidades, ciencias en tecnológicas. Rio grande y Juchitán Oaxaca. Octubre 2019.



Tallerista en la tercera feria de ciencias el Espinal Oaxaca. Octubre 2019.



Brigadas de salud, llevadas a cabo en:

- **San Agustín, Etl. Febrero 2022**
- **Magdalena Apazco, Etl. Marzo 2022**
- **Santa Rosa, Mayo 2022.**
- **Agencia Estatal de Investigaciones AEI, 22 y 23 de Septiembre de 2022**
- **Agencia Estatal de Investigaciones AEI, 15 de Diciembre de 2022**

