

Estudio preliminar de los efectos de los inhibidores de la síntesis de eicosanoides sobre la actividad de fenoloxidasa del acocil (*Cambarellus montezumae*)

Vinnitsa Buzoianu¹, Mónica Garrido¹, Marisela Villalobos¹, Itsel Alva¹
Antonio García¹, Fernando García¹ y Fidel Hernández¹⁻².

¹Universidad Simón Bolívar, ²CINVESTAV-IPN

Resumen

Uno de los mecanismos de defensa mejor caracterizados en crustáceos, es el sistema fenoloxidasa, éste es activado por componentes de pared celular microbiana como lipopolisacáridos (LPS), péptidoglicanos y β 1-3 glucanos (zimosan). En el presente estudio se midió la actividad de fenoloxidasa (FO) en la hemolinfa (HL) de *Cambarellus montezumae* en ausencia y presencia de inhibidores de la síntesis de eicosanoides. Los resultados obtenidos muestran que la dexametasona abate la actividad de la fosfolipasa A², disminuyendo significativamente su actividad, en contraste al naproxeno, no modificó la actividad de fenoloxidasa.

Palabras clave: respuesta inmune, dexametasona, naproxeno; hemolinfa, camarón, *Cambarellus*, artrópodo.

Abstract:

One of the main characteristic mechanisms of defense in crustaceans is the phenoloxidase (cyclooxygenase) system, which is activated by microbial components like lipopolysaccharide (LPS), peptideglycans and β 1-3 glucans (zymosan). The current study measured the phenoloxidase (FO) effect on the hemolymph of *Cambarellus montezumae*, in the absence and presence of inhibitors of eicosanoids synthesis.

The results show that dexamethasone eliminates the activity of phospholipase A₂, diminishing its activity considerably in contrast to naproxen, which did not show any change.

Keywords: immune response, dexamethasone, naproxen, hemolymph, shrimp, *Cambarellus*, arthropod.

Introducción

Cambarellus montezumae, es un crustáceo que se cultiva a escala comercial en México, el cual constituye una fuente de alimento rico en proteínas para humanos. Este camarón es afectado por enfermedades infecciosas, micóticas, virales y bacterianas que ponen en riesgo su cultivo. Como todos los invertebrados, *C. montezumae*, posee un sistema inmune innato caracterizado por ser inespecífico y no estar mediado por anticuerpos, lo que impide el diseño de vacunas. Los elementos principales del sistema inmune de los crustáceos están en la hemolinfa (HL) donde actúan y los descritos hasta ahora incluyen: la fagocitosis, nodulación, encapsulación, coagulación y producción de péptidos antimicrobianos. En la mayoría de estos mecanismos está involucrado el sistema de la proFenoloxidasa (proFO) el cual es un mecanismo tanto efector como regulador del sistema

inmune, compuesto por un conjunto de proteínas, aun no totalmente conocidas, que se activan en cascada y desencadenan la melanización del agente invasor. Algunos miembros de la cascada son proteasas en forma inactiva (zimógenos) que al ser activados, adquieren capacidad proteolítica llegando finalmente al corte de la proFO para generar la forma activa (FO). La FO participa en la melanización y formación de nódulos y cápsulas, así como en la liberación de moléculas opsonizantes, quimioquinesis celular y coagulación (Söderhäll y Cols., 1990; Ashida, 1991).

El sistema proFO está ampliamente descrito en los invertebrados y actúa en la amplificación de la reacción inmune y en la inactivación de microorganismos invasores; para dispararse requiere:

1.- Reconocimiento: el reconocimiento de partículas ajenas al cuerpo de los artrópodos ocurre cuando células de la hemolinfa (hemocitos) o de otros órganos como el cuerpo graso reconocen específicamente (aunque aún no está definido molecularmente cómo), componentes microbianos de la pared celular de bacterias, como lipopolisacáridos de las Gram (-), los peptidoglicanos de las Gram (+), el zimosán (β 1,3 glucanos) de levaduras y hongos, así como células o parásitos de mayor tamaño (Johansson y Söderhäll 1989; Söderhäll y Cols., 1990; Ashida, 1990) y reaccionan liberando al medio los componentes del sistema proFO.

2.- Activación: una vez en la hemolinfa, las enzimas de la vía proFO se activan una tras otra ("reacción en cascada") comenzando con la activación de al menos dos serina-proteasas llamadas proteínas activadoras de la profenoloxidasas 1 y 2. La serina-proteasa 1 actúa sobre la número dos, amplificando la reacción, y la enzima dos a su vez sobre la profenoloxidasas convirtiéndola en fenoloxidasas y activándola. Ésta última, al estar activa, es la encargada de la conversión, por oxidación, de fenoles en quinonas, las cuales se polimerizan formando melanina. La melanina inhibe la actividad enzimática tanto bacteriana como fúngica (Cerenius y Söderhäll, 2001).

En los últimos años se ha descrito, a las prostaglandinas (PGs) como moléculas moduladoras de la respuesta inmune en algunos artrópodos (Rowley et al., 2005). Las PGs derivan de los ácidos grasos esenciales de 20 carbonos, y el ácido araquidónico es el precursor más abundante; el cual puede a su vez, formarse a partir del ácido linoléico. Dado que la concentración de ácido araquidónico libre

dentro de la célula es muy baja, su disponibilidad resulta de la liberación de los depósitos celulares de lípidos mediante numerosas hidrolasas (fosfolipasa A₂, fosfolipasa C y la lipasa diacilglicerol. Estas fosfolipasas son activadas por diferentes estímulos físicos, químicos y hormonales, como son: trauma, infección, infusión con solución hipertónica, trombos, endotoxinas, estiramiento mecánico, esteroides sexuales y catecolaminas. La fosfolipasa A₂ (PLA₂) hidroliza la unión éster de los fosfolípidos de membrana, particularmente los que contienen fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina y liberan ácido araquidónico. En contraposición la fosfolipasa C separa el puente fosfodiéster, provocando una liberación de fosfatidilinositol, que libera ácido araquidónico a través de la desintegración de la lipasa diacilglicerol. Una vez liberado el ácido araquidónico, la vía de síntesis puede tomar dos direcciones: la vía de la lipooxigenasa o la vía de la ciclooxigenasa (Stanley, 2005).

Los inhibidores de la respuesta inmune seleccionados para este trabajo fueron: naproxeno, compuesto que en mamíferos causa la disminución de los mediadores de inflamación al inhibir la Ciclooxygenasa tipo I de tipo constitutivo. Por otro lado, la dexametasona que induce la lipocortina, proteína anti-inflamatoria, que inhibe la fosfolipasa A₂, lo cual inhabilita la síntesis de PGS y lipooxigenasa (Stanley, 2006).

Objetivo

En este trabajo se evaluó la actividad de la proFO en la hemolinfa de *C. montezumae* en ausencia y presencia los inhibidores de la síntesis de eicosanoides naproxeno (npx) y dexametasona (dexa).

Método

Reactivos: los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la más alta calidad y se obtuvieron de las compañías Sigma Chem (St. Louis Missouri), Invitrogen y PE Applied Biosystems. Los reactivos para electroforesis provinieron de Gibco- BRL Life Technologies.

Material Biológico: para este trabajo se utilizaron acociles adultos de ambos sexos (*C. montezumae*),

(Saussure, 1857) obtenidos comercialmente, los cuales se mantuvieron en peceras con agua corriente a una temperatura de 20 a 22 °C, alimentados con peces pequeños.

Obtención y cuantificación de proteínas: para llevar a cabo la obtención y cuantificación de proteínas, a los acociles se les inyectó al hemocele (entre la cabeza y el tórax) 100 ml de solución salina al 0.9% con los inhibidores de PGS (Npx y Dexa 100 µg / ml). La HL fue obtenida por perfusión (30 minutos post-inoculación). A las muestras se les agregaron 10 µl de un mezcla de inhibidores de proteasas (TLCK 10 mM; TPCK 10 mM y o-fenantrolina 50 mM) posteriormente se incubaron en una temperatura de 60 °C durante 10 minutos, a continuación se separó la fase acuosa por centrifugación a 13000 rpm / 5min y se tomó el empastillado, el cual se resuspendió en 40 ml ual de amortiguador de muestra 2X. La pastilla se guardó a -20 °C para cuantificación y ensayos; la cuantificación se realizó por el método de Bradford (Smith, 1989).

Separación de Proteínas: las muestras de proteínas fueron analizadas por medio de electroforesis en geles de acrilamida (PAGE-SDS) al 10% (pH 8.8), preparados según métodos estándar (Smith, 1989). Posteriormente el gel se colocó en una cámara de electroforesis agregándole amortiguador de corrida (0.025 M de Tris- glicina 0.192 M pH 8.3, SDS 0.1%). La electroforesis se realizó a 40 – 60V y a temperatura ambiente durante 16 horas. Después se tiñó el gel con azul de Coomassie (Smith, 1989).

Medición Espectrofotométrica de la actividad de la proFO: para determinar por un método colorimétrico la actividad de la FO se tomaron 20 µl de la HL, se colocaron en pozos de una multiplaca para ELISA de 96 posiciones, se les agregaron 20 µl de PBS 1X (pH de 7.4), y 10 µl de Laminarina (1 mg / ml; componente de pared celular de levaduras). Posteriormente se les agregó L-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) (4 mg / ml en amortiguador PBS 1X), se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos en oscuridad, se observaron los resultados y se midieron las densidades ópticas a 570 nm (Lanz, 1993).

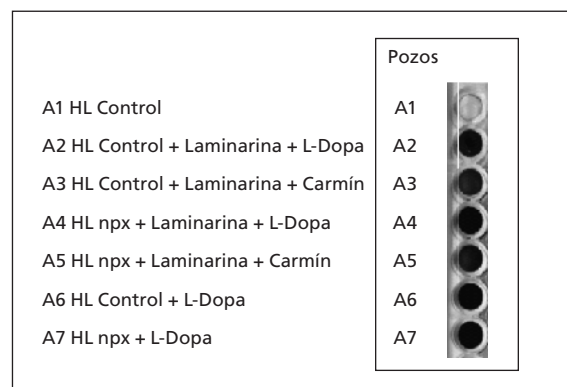
Los experimentos se hicieron por triplicado y se les aplicó la prueba estadística de Kruskal-Wallis

para evaluar si existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Resultados

Análisis de la actividad de proFO en HL de *C. montezumae* y efecto de los inhibidores: en un ensayo *in vitro* la HL de *C. montezumae* se puso en contacto con laminarina, compuesto de la pared de hongos que en otros artrópodos se ha descrito que es capaz de iniciar la cascada de la FO y en presencia de L-DOPA, el cual de manera natural esta presente en la HL y es oxidado y polimerizado por acción de la FO generando el compuesto colorido melanina y se observó la formación de un precipitado negro que indicó la funcionalidad del sistema. Cuando la L-DOPA se sustituyó por el ácido carmínico, pigmento presente en la HL del homóptero *Dactylopius coccus*, también se observó la formación de color, indicando que este sustrato, el cual es el que utiliza este insecto durante sus reacciones de melanización, también es utilizable por el sistema de FO de *C. montezumae* (figura 1a).

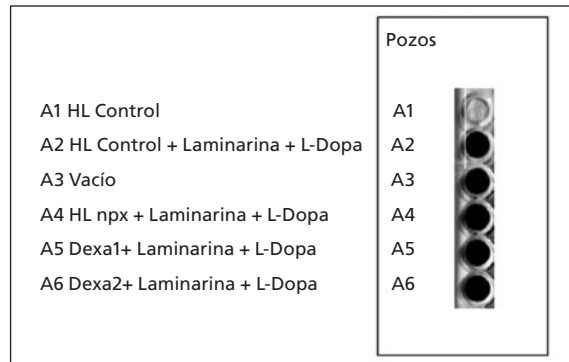
Figura 1a. Ensayo espectrofotométrico *in vitro* de la actividad de proFO de la HL de *C. montezumae*



La HL fue incubada con diferentes sustratos (L-Dopa y carmín) durante 10 minutos; posteriormente se trató con un componente patógeno (laminarina) durante 30 minutos. a) A1: HL de acocil; pozo control. A2: HL + Laminarina + L-Dopa (sustrato). A3: HL + Laminarina+ Carmín (sustrato). A4: HL + npx + Laminarina + L-Dopa (sustrato) A5 : HL + npx + Laminarina + Carmín. A6: HL + L-Dopa (sustrato). A7: HL + npx + L-Dopa (sustrato). En los pozos A2 a A7 se observa melanización.

Cuando se añadieron al sistema los inhibidores dexa y npx aún hubo actividad de melanización *in vitro* (figura 1b).

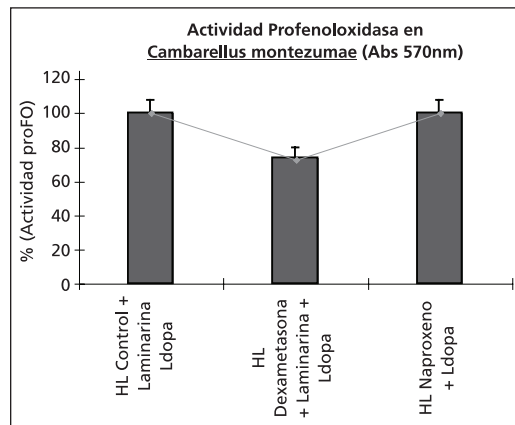
Figura 1b. Actividad de melanización por inhibidores



A1: HL de acócil; pozo control. A2: HL + Laminarina + L-Dopa (sustrato). A3: Blanco. A4: HL + npx + Laminarina + L-Dopa (sustrato) A5 : HL + dexa + Laminarina + L-Dopa (sustrato). A6: HL + dexa+ Laminarina + L-Dopa (sustrato).

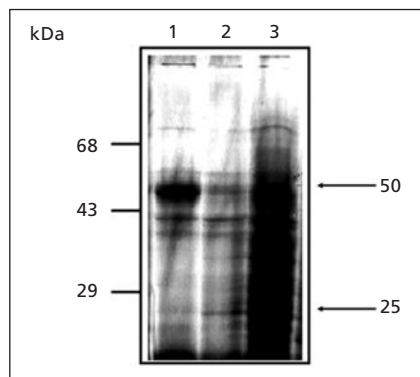
Sin embargo, cuando se midieron espectrofotométricamente las cantidades de melanina producida y se compararon estadísticamente los valores se encontró una ligera, pero significativa, disminución con la dexa (figura 2).

Figura 2. Disminución con la dexa por presencia de melanina



Cuantificación de actividad de profenoloxidasa en la respuesta inmune de *C. montezumae* en presencia de diferentes inhibidores (dexa y npx), por método espectrofotométrico a 570nm. Observándose en el tratamiento con dexa un ligero descenso en la absorbancia, mientras que en el tratamiento con npx no se presenta ninguna disminución en la actividad (n=3;Kruskal-Wallis, p < 0.05).

Figura 3. Resultados del tratamiento con naproxeno



Electroforesis en gel de poliacrilamida PAGE-SDS al 10%. Carril 1: Tratamiento con npx. Carril 2: Tratamiento con dexa. Carril 3: Control. En los patrones proteicos de HL se observa un enriquecimiento en la banda de 50 kDa en el tratamiento con npx (1), a diferencia de los otros dos tratamientos (2 y 3).

Discusión


En el presente trabajo se observó el efecto de la dexa y npx en la ruta proFO en *C. montezumae*.

En el lepidoptero *Galleria mellonella* se reportó que la melanización producida en HL por la acción de agentes microbianos es inhibida totalmente en presencia de dexa y npx (Mandato, Moore, Downer, 1996). En contraste en *C. montezumae* el efecto no fue tan radical. Sin embargo, quedan otras condiciones por probar como por ejemplo analizar dosis más altas de los inhibidores. Cabe aclarar, que esta es la primera descripción de la interacción de estos compuestos con la HL del crustáceo. Aunque la inhibición de la melanización fue parcial, se puede observar, al realizar la cuantificación de la actividad profenoloxidasas, que la dexa tiene un efecto parcial sobre la melanización, indicando que ha actuado como inhibidor; a diferencia de lo observado en npx, donde no se apreció ningún cambio.

Al analizar las proteínas de la HL por medio de electroforesis en gel de acrilamida, se observó que una banda de 50 kDa solamente se presentan en los carriles de npx y de control, no así en el carril de dexa. Con el antecedente de que las moléculas del sistema inmune de artrópodos se ven afectadas en actividad y síntesis por los inhibidores de la síntesis de eicosanoides la (s) proteína (s) de 50kDa pueden ser consideradas a candidatos a participar del sistema inmune. Por otra parte, también se observó la presencia de una banda prominente de 20 kDa, que solamente aparece en el carril de dexa. Tomando como referencia su peso, podría especularse de que se trate de un posible péptido antimicrobiano, sintetizado como una ruta alternativa por el organismo, al verse inhibidas algunas rutas de respuesta inmune. Para conocer la identidad y posible papel de estas moléculas se recurrirá a su caracterización en trabajos posteriores por medio de electroforesis bidimensional y MALDI-TOF.

Se tiene también contemplado evaluar la actividad de melanización en presencia de otros inhibidores de PGS no esteroidales (AINs) como son los ibuprofenos, ácido acetilsalicílico, ácido mefenámico o bien la indometacina, actuando de manera similar que el npx con el fin de inhibir las diferentes isoformas de ciclooxigenasas (I y II) que están involucradas en la formación de PGs, en el caso de compuestos de naturaleza corticosteroides, los cuales su mecanismo de acción inhibe la producción de la fosfolipasa A₂, la 5-lipo-oxigenasa y la ciclooxigenasa; se pretende realizar ensayos de dosis-respuesta para estudiar la posible acción de estos fármacos.

Conclusión

El estudio de la acción de las prostaglandinas y su papel en la inmunidad de crustáceos, es de gran interés comercial ya que abre una enorme posibilidad para diseñar medidas más eficientes de control de enfermedades en estos invertebrados, con el propósito de incrementar las producciones comerciales. 

Referencias

- Ashida, M: (1990). *The profenoloxidasas cascade in insect immunity. Response Immunologic.* 141, 898.
- Cerenius L, Söderhäll K, (2001). *The prophenoloxidasase-activating system in invertebrates.* Immunological Reviews 198, 116-126
- Johansson, M. W, y Söderhäll, K. (1989). *Cellular immunity in crustaceans and the proPo System.* Parasitology Today. 5: 171.
- Lanz-Mendoza H, Hernández S, Garrido-Guerrero E, Tsutsumi V, Aréchiga H. (1993). *Prophenoloxidasase system activation in the Crayfish: Procambarus clarki.* Dev Comp Immunol 17, 399-406.
- Mandato, C. Diehl-Jones. W, Moore, S. Downer, R. (1996). *The effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on prophenoloxidasase activation, phagocytosis and cell spreading in Galleria mellonella.* Insect Physiology. 43, 1 – 8
- Miller, J. et al., (1994). *Eicosanoids mediate insect nodulation responses to bacterial infections, Insect Biochemistry/ Physiology Laboratory, Department of Entomology, University of Nebraska, Lincoln.*
- Ratcliffe, N. A. y Götz, P. (1990). *Funcional studies on insect haemocytes including non-self recognition.* Response Immunologic. 141, 919.
- Rowley, A, Vogan, C, Taylor G, Clare A. (2004). *Prostaglandins in non- insectan invertebrates: recent insights and unsolved problems.* Experimental Biology, 208,3-14.
- Smith J. (1989). *Electrophoretic separation of proteins.* In: Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K, Editors. Current protocols in molecular biology. New York: Green Publishing and John Wiley and Sons. 10.2.1-10.2.9.
- Stanley, D., (1998). *Eicosanoids mediate insect celular immune reactions to bacterial infections. Recent Advanced in Prostaglandin, Tromboxane an Leucotriene Research,* Edit by Sinzinger et al., Plenum Press, New York.
- Stanley, D. (2006). *Prostaglandins and other eicosanoids in Insects: Biological Significance,* Annu. Rev. Entomol.51, 25-44.