



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

"RESPUESTA INMUNE HUMORAL DEL ACOCIL
PROCAMBARUS CLARKII (CRUSTACEA, DECAPODA):
ANALISIS DE LA CAPACIDAD AGLUTINANTE
DE SU HEMOLINFA SOBRE ERITROCITOS DE
DIVERSOS VERTEBRADOS"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A D A P O R :

CUAUHTEMOC JUAN HUNBERTO LANZ MENDOZA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO; 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco al Dr. José Antonio Ramírez Almaraz, jefe del laboratorio de Inmunología Comparada de la ENCB, por la dirección de este trabajo. También agradezco al M. en C. Rubén López Santiago por la discusión y corrección de este manuscrito.

DEDICATORIA

A MIS ABUELOS POR SU AMOR INCONDICIONAL.

A MIS PADRES CON MI MAS PROFUNDO RESPETO Y AMOR.

A MI HERMANA POR SU CARIÑO Y COMPRESION.

A LOS AMIGOS DE TODA MI VIDA : JOSE ANTONIO
MUNGUIA PEREZ, RAFAEL E. RAMIREZ FLORES Y
RAMON URIEGAS URIEGAS.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE PROFESION :
EFRAIN GARRIDO GUERRERO, EDUARDO EGGERS
MUÑOZ E IGNACIO MORENO SUCHIL.

A LOS COMPAÑEROS DE IMAGEN BIOLOGICA.

A MIS COMPAÑEROS DE GRUPO (03).

A MIS AMIGOS Y MAESTROS DE LA UIICSE.

A TODOS Y CADA UNO DE USTEDES QUE LES DEBO
EN PARTE LO QUE SOY.

LOS HECHOS
SON SIEMPRE VACIOS,
SON RECIPIENTES
QUE TOMARAN
LA FORMA
DEL SENTIMIENTO
QUE LOS LLENE.

- J.C. ONETTI.

.....CUAN CREATIVA PUEDE SER LA OBSTINACION
CUANDO VA UNIDA A LA PACIENCIA.

- E. CANETTI.

'LA SENTENCIA PRIMERO....EL VEREDICTO
DESPUES'.

- ALICIA EN EL PAIS DE LAS MARAVILLAS.

INDICE

1.0	INTRODUCCION -----	1
1.1	Características de la respuesta inmune de los invertebrados. -----	2
1.1.1	Barreras fisicoquímicas.-----	2
1.1.2	Reconocimiento de lo propio y de lo ajeno.--	3
1.1.3	Respuesta celular.-----	5
	a) Fagocitosis y encapsulamiento.	
1.1.4	Respuesta humoral.-----	7
	a) Sistema de la Profenoloxidasa (Ppo).	
	b) Hemolisinas y aglutininas.	
2.0	OBJETIVOS. -----	19
3.0	MATERIAL Y METODOS.-----	21
3.1	Obtención de los animales.-----	21
3.2	Obtención de la hemolinfa.-----	21
3.3	Preparación de eritrocitos.-----	22
3.4	Ensayos de hemaglutinación.-----	23
3.5	Pruebas de absorciones.-----	24
3.6	Inhibiciones con distintos carbohidratos.----	24
4.0	RESULTADOS -----	29
4.1	Resultados de las hemaglutinaciones y títulos de aglutinación. -----	29
4.2	Resultados de las absorciones. -----	30
4.3	Resultados de las inhibiciones con distintos carbohidratos. -----	33
4.3.1	Inhibición de la aglutinación de eritrocitos humanos. -----	34
4.3.2	Inhibición de la aglutinación de eritrocitos de ratón, rata, conejo y cobayo. -----	35

5.0	DISCUSION.	-----	45
6.0	CONCLUSIONES.	-----	53
7.0	BIBLIOGRAFIA.	-----	54

1.0

INTRODUCCION

Los invertebrados son un conjunto de organismos sumamente heterogéneos, no existe una característica que ostenten en común y salvo la carencia de columna vertebral, son enormes las diferencias en tamaño, en diversidad estructural y en adaptación a diferentes modos de existencia.(55)

Actualmente se han descrito más de un millón de especies animales, de las cuales el 5% aproximadamente pertenecen a los vertebrados. Las especies restantes, que comprenden el 95 % del reino animal, son invertebrados.(24)

Hay invertebrados que son de gran importancia para el hombre, algunas especies son de interés alimenticio y otras son grandes plagas o parásitos estrictos. Sin embargo, aun con la importancia antes descrita, la respuesta "inmune" en invertebrados ha sido poco estudiada.

1.1 CARACTERISTICAS DE LA RESPUESTA INMUNE EN INVERTEBRADOS.

Los invertebrados carecen de una respuesta inmune como la conocida en vertebrados. Algunos investigadores la llaman "cuasi inmune" (27), pues la respuesta a agentes extraños es inespecífica, la memoria es de corta duración, no se ha comprobado que sea transferible en todos los casos y no es inducible (16).

Todos los invertebrados poseen diversos mecanismos para evitar la entrada de agentes nocivos o eliminarlos en caso de que penetren. Estos mecanismos van aumentando en complejidad en diversas especies, pero al parecer conservan una estructura básica, a la que se añaden otros mecanismos que hacen a la estructura más eficiente.

A continuación se analizarán algunos de los mecanismos de defensa presentes en invertebrados.

1.1.1 Barreras fisicoquímicas.

Como los vertebrados, los invertebrados presentan barreras fisicoquímicas muy eficientes como primera línea de

defensa. Muchos celenterados, anélidos, moluscos y protocordados tienen células secretoras de moco, llamadas también glandulares, que evitan la entrada de patógenos (44). Por otro lado, gran número de invertebrados presentan exoesqueletos o conchas, que son barreras funcionales contra la invasión de parásitos (44).

Algunos invertebrados, como crustáceos e insectos, presentan secreciones de cera en su cutícula, que les proporciona cierta protección a ataques bacterianos (14). Enzimas digestivas y un pH gástrico ácido proporcionan cierto grado de protección contra agentes infectivos ingeridos en los alimentos (44).

1.1.2 Reconocimiento de lo propio y de lo ajeno.

Numerosos reportes indican que los invertebrados pueden discriminar entre diferentes materiales extraños (13,25,31,32). Este reconocimiento ha sido detectado usando técnicas de trasplantes en varios invertebrados coloniales como esponjas y corales, además de otros invertebrados como anélidos, equinodermos y tunicados.

Se ha dicho que el tipo más primitivo de reconocimiento es el presentado por algunos protozoarios al rechazar el trasplante de núcleos extraños. Este fenómeno depende principalmente de procesos bioquímicos más que del reconocimiento y respuesta a diferencias antigénicas entre las diversas especies (51).

Experimentos con esponjas, corales, equinodermos y tunicados han demostrado la existencia de memoria a trasplantes xenogénicos, siendo esta de corta duración (28).

Los insectos presentan un patrón heterogéneo de respuesta respecto a los trasplantes. Algunos investigadores han demostrado que no son capaces de rechazar alo y xenoinjertos. sin embargo, Thomas y Ractliffe (52) demostrarán que xenoinjertos de especies poco emparentadas son rechazados. Faltan más experimentos para establecer una afirmación categórica respecto a estos invertebrados y el rechazo de injertos.

Los anélidos son los invertebrados que más se han utilizado en el estudio de rechazo de injertos. Trabajos con

Eisenia fetida y Lumbricus terrestris han demostrado memoria cuando se les han aplicado alo y xenoinjertos, pero ocasionalmente la aplicación del segundo injerto homólogo e inclusive heterólogo resultan en un aumento de la supervivencia o un no rechazo en lo absoluto. (17,18).

En los tunicados, se ha descrito un sistema de antígenos que aun no se comprende completamente, y que son responsables del rechazo o la fusión entre diversas especies de tunicados. Esto podría representar los ancestros del sistema de histocompatibilidad en mamíferos (33).

1.1.3 Respuesta celular.

a) Fagocitosis y encapsulamiento.

La fagocitosis, desde un punto de vista evolutivo, precede al desarrollo de otros mecanismos de defensa, tanto específicos como inespecíficos. Los invertebrados más primitivos, los protozoarios, son capaces de reconocer individuos de su misma especie, fagocitando partículas extrañas y mostrando reconocimiento de lo propio (33).

La fagocitosis en esponjas y corales ha sido poco estudiada, principalmente por la dificultad en la manipulación de estos organismos. Aun así, se han descrito células con función fagocítica, a las que se les ha dado diversos nombres (fagocitos y coanocitos). (5,44).

En invertebrados celomados como anélidos, moluscos e insectos, la fagocitosis es llevada acabo por celulas llamadas celomocitos. Estas células son muy eficientes en la eliminacion de particulas extrañas y en ocasiones se ve incrementada su capacidad fagocítica por la presencia de sustancias opsonizantes presentes en la hemolinfa (42,53).

Parásitos de gran tamaño invaden la cavidad celómica de los invertebrados, y no pueden ser fagocitados; estos sin embargo, son neutralizados por el organismo formando nódulos o cápsulas alrededor de ellos. La cápsula resulta de una acumulación de células del huésped (hemocitos o celomocitos) alrededor del parásito, pudiendo presentar una reacción secundaria de melanización. Cuando a la cápsula se le precipitan sales de calcio se forma un quiste (28,41).

Entre los parasitos encapsulados se incluyen acantocéfalos, céstodos, nemátodos, hongos y en ocasiones algunos dípteros (44).

1.1.4 Respuesta humoral.

a) Sistema Profenolxidasa (Ppo) y factores del complemento.

Recientemente se ha tratado de demostrara el posible papel del sistema Ppo en la defensa de invertebrados contra patógenos (44).

Este sistema fué reportado inicialmente en crustáceos y posteriormente en insectos, pero no está confinado unicamente a artrópodos y puede ser importante en otros invertebrados. Maluscos y anélidos, por ejemplo, liberan melanina durante la respuesta celular, y este pigmento es formado por la activación del Ppo . Este pigmento puede inhibir quitinasas microbianas y proteasas, ademas puede proteger contra radiación ultravioleta . Por otro lado, precursores de la melanina han demostrado ser citotóxicos y fungistáticos (50).

Probablemente, el sistema esta presente en la hemolinfa en condiciones fisiológicas y una vez activado por la serina proteasa de la cutícula, activa la profenoloxidasa, convirtiendola a fenoloxidasa y formando melanina.

Pequeñas cantidades de productos bacterianos (beta 1,3 glucano y endotoxinas) activan el sistema Ppo, y durante el proceso, una serinproteasa induce la coagulación de la hemolinfa. Tambien genera proteínas pegajosas, las cuales se pegan a la superficie del material extraño funcionando como marcadores de reconocimiento, y muchas veces dá como resultado la melanización del material extraño (50).

Otra faceta interesante del sistema Ppo, es la similitud con la vía alterna del complemento de mamíferos. Ambos sistemas son activados por endotoxinas bacterianas y beta 1,3 glucano, y la coagulación es en ocasiones, el resultado de la activación de ambas (55).

Por otro lado, se han encontrado factores muy parecidos al complemento de humanos en lisados de leucocitos celómicos de equinodermos. Estas observaciones pueden ser

importantes indicadores de la filogenia del sistema inmune en vertebrados. Sin embargo, son necesarios más trabajos para justificarse que existe un factor o factores del complemento en invertebrados. (2,3,6,7,8).

b) Aglutininas y lisinas.

Muchos invertebrados contienen en su hemolinfa factores capaces de aglutinar y lisar bacterias, protozoarios y eritrocitos de distintos vertebrados (9,30).

En forma natural los invertebrados tienen una amplia gama de sustancias con actividad lítica, incluyendo a la lisozima (35).

La lisozima se encuentra ampliamente distribuida en los invertebrados. Es una enzima mucolítica que actúa en el enlace entre N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico, presente en la pared celular de muchas bacterias (35). Se ha demostrado que la lisozima es inducible, la producción alcanza su máximo pico a las 20

horas despues de la inducción, quedando solo restos de la protección a las 72 horas (21,35).

Se ha detectado lisozima en gránulos de células hemostáticas, y su liberación coincide con la coagulación (44).

Otras lisinas se han encontrado en el suero de invertebrados, incluyendo factores líticos contra protozoarios y eritrocitos de vertebrados. Las hemolisinas son en general termolábiles a 56 grados C, sensibles a enzimas proteolíticas y requieren calcio (44).

La induccion de protección ha sido estudiada desde hace varios años. Gringich en 1964 (36), demostró que el hemíptero Ancolpitus fasciatus puede producir una lisina para Pseudomona aeruginosa después del reto con una dosis simple de vacuna preparada con la bacteria muerta por calor . Esta vacunación provoca una corta resistencia a la infección por bacterias vivas. La cantidad de material lítico disminuye lentamente entre 24 y 72 horas y después declina rapidamente (20).

Posteriormente, Gingrich observó que la protección e inducción de esta sustancia bacteriolítica no es específica. La inyección de solución salina, o simplemente la introducción de la aguja en el cuerpo del insecto es suficiente para inducir una respuesta protectora contra posteriores retos con dosis letales de bacterias vivas. En este caso, no se puede considerar como una respuesta específica, y probablemente se trata de una respuesta a una gran variedad de estímulos, que perturban el balance fisiológico del animal.

En años más recientes, Boman inyectó a la pupa de la polilla Hyalophora cecropia con bajas dosis de bacterias no patógenas, detectando quince proteínas nuevas en la hemolinfa después de periodos de 8 a 10 horas. Algunas de estas proteínas han sido purificadas y secuenciadas, pero su función y propiedades no se han aclarado (44).

Las aglutininas también se encuentran ampliamente distribuidas en los invertebrados, y se caracterizan por unirse específicamente a un carbohidrato, por lo que algunos investigadores las denominan lectinas (47,48).

El primero en observar la existencia de aglutininas en invertebrados, fué Noguchi en 1903 (36), en líquido celómico de Limulus polyphemus. Se han encontrado lectinas en gran cantidad de especies de invertebrados, y generalmente se realizan ensayos de hemaglutinación con eritrocitos de vertebrados para evidenciar su presencia.

Se usan eritrocitos debido a que son un gran mosaico antigénico y presentan principalmente carbohidratos y algunas proteínas en la superficie externa de su membrana (39).

En todos los casos en que se ha estudiado con detalle, se han encontrado que son glicoproteínas, tienen movilidad en beta y gama globulinas, y son dependientes de calcio o de otro catión divalente para su actividad (39,56).

Marchalonis y Edelman , en 1968 aislaron y caracterizaron la hemaglutinina de Limulus polyphemus (figura 1) (37). La hemaglutinina intacta es una molécula que pesa 400,000 daltones, y esta compuesta de 18 subunidades. Cada subunidad tiene un peso molecular de 22,500 daltones. La representación esquemática, basada en

microscopía electrónica, demuestra que la molécula es de forma hexagonal, está vacía en el centro y su diámetro aproximado es de 10 amstrongs (figura 2) (23). Esta molécula presenta obvias diferencias con las inmunoglobulinas; principalmente :

- 1) La molécula contiene solo un tipo de subunidad.
- 2) Las subunidades están sujetas unicamente por enlaces no covalentes.
- 3) Requiere la presencia de calcio para mantener su estructura intacta (23,37).

Las lectinas hasta ahora encontradas en invertebrados, se unen generalmente a ácido N-acetil neuraminico, N-acetil galactosamina, N-acetil glucosamina, galactosa y compuestos relacionados . (10).

En algunos invertebrados no se han encontrado lectinas. Varios factores pueden participar en la ausencia temporal de las lectinas, principalmente; época del año, enfermedades, muda y edad. El título de lectinas en el equinodermo Antiocordis crassipina varía durante todo el año; todos los individuos tienen lectinas en abril y mayo,

la mayoría tienen en julio y agosto y únicamente unos pocos en noviembre (46).

Langostas Homarus americanus infectadas con Gaffkia₂ homari presentan una pérdida de las lectinas encontradas en esta especie.

Maja squinado, el cangrejo araña, sufre una pérdida espontánea del título de lectinas previo a la muda. En individuos jóvenes del cangrejo Birgus latro aparentemente no hay lectinas y el título se ve incrementado con el tamaño del animal (presumiblemente con la edad) (4).

Poca información existe sobre la síntesis de las lectinas en invertebrados. Extractos de hemocitos de la langosta Homarus americanus contienen altas concentraciones de lectinas (19,26). También se han marcado hemocitos de la cucaracha Leucophaea maderae, con anticuerpos fluoresceinados contra lectinas del suero, localizándose dos lectinas diferentes en la superficie de la célula. Estas mismas células tratadas con cicloheximida inhiben este marcaje. Estos datos sugieren, que la síntesis se lleva

acabo en los hemocitos, sin embargo hacen falta más trabajos para poder generalizar los resultados. (1).

Se han propuesto varias funciones de las lectinas en invertebrados; a continuación se enumeran las más importantes:

1) Como moléculas de Reconocimiento.

Se ha reportado ampliamente que las lectinas participan en la opsonización de partículas que van a ser fagocitadas, en un proceso análogo al presente en vertebrados, (42,53). Probablemente las lectinas reaccionan con la superficie de partículas extrañas y el complejo formado se acopla a un receptor de la membrana del fagocito, algunas bacterias y virus pueden unirse directamente a la membrana de los fagocitos .

Renwartz (45), propone tres diferentes vías por las cuales las lectinas reconocen las partículas extrañas :

a) Las lectinas ,en la superficie de los fagocitos interactua con las moléculas de carbohidratos presentes en la membrana de los microorganismos.

b) Lectinas libres en la hemolinfa (lectinas humorales) se unen a las moléculas de carbohidratos de los microorganismos, y este complejo se une a los receptores de las células fagocíticas, funcionando como opsonina.

c) Diversos carbohidratos de la superficie de los microorganismos se unen a la superficie de las membranas de las células fagocíticas.

2) Como moléculas transportadoras de carbohidratos y de iones (38).

3) Como moléculas mediadoras de simbiosis (43).

La función más estudiada ha sido la opsonización, pero falta la realización de experimentos con otros enfoques para discernir claramente la o las funciones de las lectinas de invertebrados. La ubicuidad y diversidad de las mismas sugieren que son funcionalmente importantes.

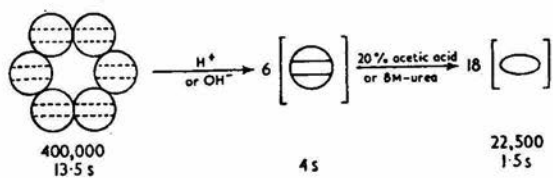


FIGURA 1. Modelo estructural de la hemaglutinina de Limulus polyphemus. (Tomado de Marchalonis y Edelman, 1968).

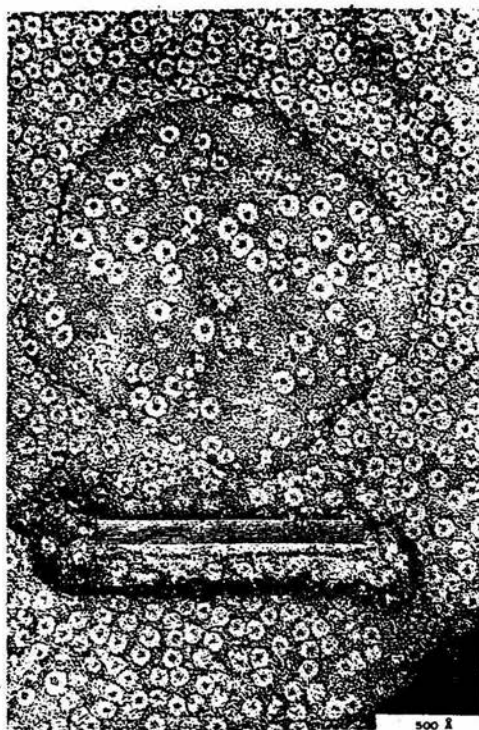


FIGURA 2. Fotografía a microscopio electrónico de la hemaglutinina de Limulus polyphemus. (Tomada de Fernandez- Moran, Marchalonis y Edelman 1968.)

2.0

OBJETIVOS.

El estudio de las aglutininas (lectinas) de los invertebrados, nos pueden ayudar a comprender algunos fenómenos fisiológicos de la respuesta a agentes extraños por los invertebrados. Actualmente, se sabe que algunas especies de invertebrados tienen aglutininas capaces de opsonizar partículas extrañas, y por lo tanto, de facilitar la eliminación de estas partículas por células fagocíticas. Poco se sabe sobre otras funciones y papel biológico que estén desempeñando.

Por otro lado, aunque están ampliamente distribuidas dentro de los invretebrados, pocas aglutininas han sido estudiadas y caracterizadas, comparando el amplio número de especies de invertebrados.

Asimismo, la especie Procambarus clarkii ha sido muy estudiada en nuestro país en aspectos neurofisiológicos y esto podría ayudarnos a comprender los mecanismos de reconocimiento que se encuentran en este organismo, dada la relación existente entre el sistema inmune y el sistema neurosecretror (4, 46).

El objetivo general del presente trabajo es evidenciar la presencia de lectinas en la hemolinfa del acocil P. clarkii.

Los objetivos particulares son los siguientes:

- 1) Estudiar la capacidad de la hemolinfa de P. clarkii para aglutinar eritrocitos de distintas especies de vertebrados.
- 2) Obtener los títulos de aglutinación del suero con los distintos eritrocitos.
- 3) Analizar el número de distintas aglutininas presentes en la hemolinfa.
- 4) Estudiar los carbohidratos que inhiben más eficazmente la actividad de la o las aglutininas, a fin de establecer la especificidad de estas últimas.

3.0 MATERIAL Y METODOS.

3.1 Obtención de animales.

Los animales se obtuvieron del río Conchos, localizado en el estado de Chihuahua. Se utilizaron sin distinción de sexo, en etapa C o D del ciclo de intermuda y con un tamaño aproximado de 10 a 15 cms. Se utilizaron en esta etapa de intermuda debido a que los organismos presentan el exoesqueleto duro y su manipulación es más sencilla, además hay evidencias que en otros crustáceos como Maja squinado se pierde la actividad de lectina durante la etapa de muda (4). (Figura 3)

Los organismos se alimentaron una vez por semana con hígado de res, y se mantuvieron en estanques con agua corriente y ciclos normales de luz oscuridad.

3.2 Obtención de la hemolinfa.

Se sangraron grupos de 50 animales por punción intracoxal, con jeringas de plástico de 5 ml. y con agujas del número 22 (Figura 4). La hemolinfa obtenida se pasó a

un macerador de tejidos, donde se dejó coagular y posteriormente se rompió el coágulo con el pistón del macerador. La hemolinfa así tratada no coagula, y se centrifuga a 2000 g por 10 minutos, eliminando los restos sólidos y guardándose en alícuotas de 5 cc., en tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm, y en congelación a -10°C hasta su uso.

3.3 Preparación de eritrocitos.

Los eritrocitos humanos (A, B y O), de rata, conejo, cobayo, carnero y cabra se colectaron en solución de Alsever al 50 % y se conservaron en refrigeración a 4°C . Los eritrocitos de ratón, pez y rana fueron obtenidos en heparina y se utilizaron inmediatamente, debido a que presentan una gran labilidad y se dificulta su conservación.

Las células así obtenidas, fueron lavadas cuatro veces en solución salina al 0.9 %, y ajustadas a la concentración requerida.

3.4 Ensayos de hemaglutinación.

Los eritrocitos de las distintas especies de vertebrados se colocaron en placas de vidrio, a diferentes concentraciones (1,2 y 5 % en solución salina), y se observó la presencia o ausencia de aglutinación mezclandolos volumen a volumen con la hemolinfa. Se usarón como controles positivos, sueros comerciales para grupos sanguíneos humanos, y control negativo albúmina al 1 % preparada en solución salina.

La hemolinfa se título contra los eritrocitos con los que se observo aglutinación, usando el equipo de microtitulación (Microtiter, Cooke Engineering Company). (Figura 5).

A cada pozo de las placas del microtitulador (excepto el primero) se le añadió solución salina isotónica en volumen de 25 microlitros. En el primer pozo se colocaron 50 μ l de la hemolinfa sin diluir, y se hicieron diluciones al doble en el resto de los pozos utilizando las varillas del microtitulador. Posteriormente, se añadieron 25 μ l de eritrocitos preparados a una concentración del 1 % en

solución salina-albúmina al 1 %, anotando la última dilución donde se apreció aglutinación.

3.5 Pruebas de absorciones.

Los eritrocitos de los distintos vertebrados, que dieron aglutinación positiva, fueron preparados al 10, 50 y 100 % en solución salina al 0.9 %, y se mezclaron con la hemolinfa (v/v) durante una hora, con agitación cada 10 minutos. La mezcla se centrifugo a 2000 g para eliminar los eritrocitos, y el sobrenadante se usó para pruebas de aglutinación con los diversos eritrocitos preparados al 1 %.

Los sobrenadantes se colocaron en los pozos de la placa del microtitulador, y se agregaron los eritrocitos observándose con cuales eritrocitos permanecía la capacidad de aglutinar.

3.6 Inhibición de la hemaglutinación con carbohidratos.

La hemolinfa se mezcló v/v con distintos carbohidratos (arabinosa, manosa, glucosa, lactosa, galactosa y N-acetil glucosamina; Sigma Chemical Co. St. Louis ,Missouri.),

preparados a una concentración de 0.2 M en solución salina 0.9 % , durante 30 minutos con agitación cada 10 minutos. Posteriormente, se colocaron 50 μ l de la hemolinfa así tratada, en el primer pozo, y se hicieron diluciones al doble en solución salina 0.9 %. Finalmente, se agregaron los eritrocitos al 1 % en cada pozo.

Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

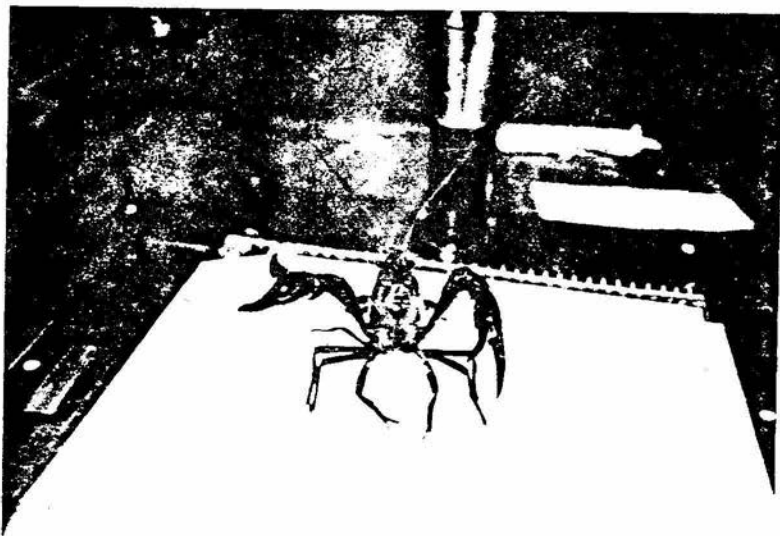


FIGURA 3 , Acocil Procambarus clarkii Girard,
(Crustacea, Decapoda), colectado
en el río Conchos en el estado de
Chihuahua.



FIGURA 4. Obtención de la hemolinfa por punción intracoxal.

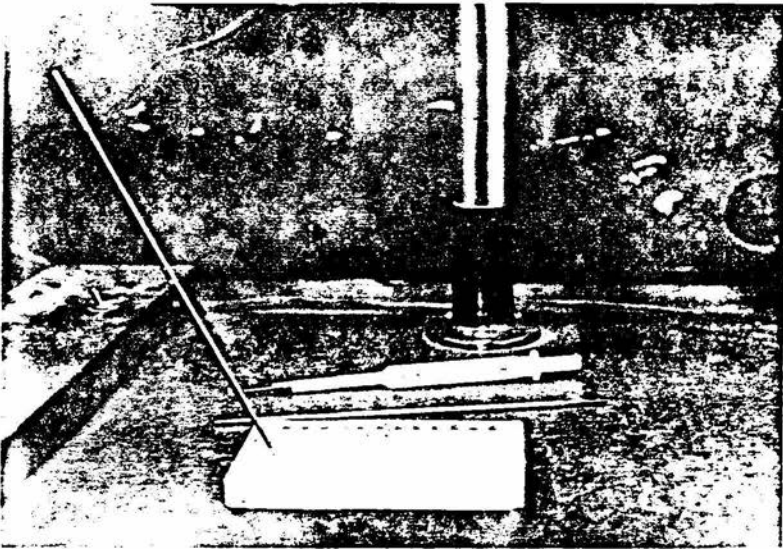


FIGURA 5. Microtitulador con varilla dilutora.

4.0 RESULTADOS.

4.1 Resultados de las hemaglutinaciones y títulos de aglutinación.

Una de las formas más sencillas para evidenciar la presencia de lectinas es la prueba de aglutinación con eritrocitos. Estos presentan una gran cantidad de carbohidratos sobre su superficie, asimismo los eritrocitos al aglutinarse forman redes que pueden observarse a simple vista.

Los eritrocitos de las distintas especies probadas se prepararon a diferentes concentraciones, se mezclaron volumen a volumen con la hemolinfa y se observó la presencia o ausencia de aglutinación.

Los eritrocitos que se aglutinaron fueron : Eritrocitos humanos (A,B y O), ratón, rata, conejo, cobayo, rana y pez. Los eritrocitos que no presentaron aglutinación fueron de cabra, carnero, guajalote, gorrión y res (Ver tabla I).

La hemolinfa se título con aquellos eritrocitos que presentaron aglutinación con el propósito de observar la intensidad de aglutinación y poder seleccionar los eritrocitos para las pruebas posteriores.

El título se obtuvo por medio del uso de placas de microtitulador. El título más alto fue el encontrado para eritrocitos de ratón (1:256), seguido de eritrocitos de rata (1:32), conejo (1:16), A y B (1:16), O (1:8), Cobayo (1:8), Rana (1:4) y Pez (1:2), (Ver tabla I).

Las diferencias en aglutinación e intensidad pueden deberse a la ausencia o a la diferencia en la cantidad de carbohidrato presente en la superficie del eritrocito.

4.2 Resultados de las absorciones.

Uno de los métodos más usados en la búsqueda del número de lectinas en la hemolinfa de invertebrados ha sido la pruebas de absorciones con distintos eritrocitos (56), pues nos permite observar la capacidad de retener o no la función de aglutinar eritrocitos de la misma especie cuando

han sido puestos en contacto previamente con el eritrocito homólogo.

Los tipos de eritrocitos que presentaron aglutinación, se prepararon al 10, 50 y 100 % en solución salina, se mezclaron con la hemolinfa volumen a volumen durante una hora y la mezcla se centrifugo para eliminar los eritrocitos. El sobrenadante se recupero y se observo con que eritrocitos permanecia la capacidad de aglutinar.

Cuando la hemolinfa se absorbe con eritrocitos humanos al 10,50 y 100%, se pierde la capacidad para aglutinar eritrocitos humanos, de conejo y cobayo, pero continua aglutinando los eritrocitos de ratón y rata. Probablemente, cuando la hemolinfa se absorbe con eritrocitos humanos tambien se absorbe a las lectinas que reconocen los carbohidratos presentes en los eritrocitos de conejo y cobayo.

La hemolinfa absorbida con eritrocitos de ratón presenta variaciones dependiendo de la concentracion de eritrocitos usada. Asi, es posible ver, que hemolinfa absorbida con eritrocitos al 10 % continua aglutinando

eritrocitos al humanos A,B y de conejo. Al modificar la concentración de eritrocitos al 50 y 100%, solo permanece la capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo.

Con eritrocitos de rata sucede algo similar, pues con eritrocitos al 10% la hemolinfa sigue aglutinando eritrocitos humanos B y O, de ratón y conejo, pero al utilizar una concentración del 50%, solo aglutina eritrocitos de conejo. Al 100% se pierde totalmente la capacidad de aglutinar cualesquiera de los eritrocitos probados.

La hemolinfa tratada con eritrocitos de conejo al 10 % continua aglutinando todos los eritrocitos, excepto los de conejo y grupo sanguíneo humano A. Al absorber la hemolinfa con eritrocitos al 50 y 100 % continua aglutinando eritrocitos de ratón y rata.

Con los eritrocitos de cobayo se observa una distribución parecida a la dada por eritrocitos de conejo, solo que al 10 % no aglutina eritrocitos de conejo y cobayo. Al 50 y 100% la aglutinación de eritrocitos es igual a la presentada con eritrocitos de conejo.

Estos resultados indican, que las absorciones dan resultados más claros cuando los eritrocitos estan preparados al 50 y 100 %. Probablemente la absorción esta relacionada directamente con la concentración y los eritrocitos al 50 y 100% absorben de manera más adecuada a las lectinas, y por esta razon los resultados son más homogéneos. Los eritrocitos preparados al 10 %, al parecer, no son suficientes y dejan aglutininas libres que pueden continuar aglutinando eritrocitos.

Estos resultados se encuentran en las tablas 2,3 y 4.

4.3 Resultados de las inhibiciones con distintos carbohidratos.

La capacidad que tienen las lectinas de unirse a carbohidratos nos permite estudiar la especificidad y naturaleza química del receptor de las mismas, siendo este un punto previo e importante para analizar su posible actividad biológica.

El paso siguiente fué observar el efecto de distintos azúcares sobre la capacidad aglutinante de la hemolinfa con

el propósito de buscar la especificidad de las lectinas. La hemolinfa se mezcló volumen a volumen con distintos carbohidratos preparados a una concentración de 0.2 M durante 30 minutos. Posteriormente se colocó la hemolinfa en placas del microtitulador, se agregaron los eritrocitos y se observaron las diferencias en los títulos de aglutinación.

4.3.1 Inhibición de la aglutinación de eritrocitos humanos A, B y O, con distintos carbohidratos.

La aglutinación de eritrocitos humanos de tipo A es eficazmente inhibida por la N-acetilglucosamina (100 %). La manosa presenta una inhibición de 1:16 a 1:1; lactosa, glucosa y galactosa inhiben de 1:16 a 1:4 y con arabinosa no se observa inhibición. (Ver figura 5)

Con eritrocitos humanos tipo B, se observa una inhibición de 1:16 a 1:8 con arabinosa, manosa, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Con lactosa no se observa inhibición. (Ver figura 6)

Usando eritrocitos humanos tipo O, se observa que el mejor inhibidor es N-acetilglucosamina, el cual inhibe en todas las diluciones. Glucosa inhibe de 1:8 a 1:1, galactosa hasta 1:2 y lactosa, arabinosa y manosa hasta 1:4. (Ver figura 7)

Los mejores inhibidores de la actividad aglutinante para eritrocitos de vertebrados fueron la N-Acetilglucosamina, glucosa y manosa, lo que nos permite suponer la presencia de lectinas que reconozcan estos azúcares o estructuras similares.

4.3.2 Inhibición de la aglutinación de eritrocitos de ratón, rata, conejo y cobayo.

Con eritrocitos de ratón se observa una inhibición de 1:256 a 1:64 con lactosa y de 1:256 a 1:128 con manosa, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. Con arabinosa no se observa inhibición. (Ver figura 8)

Con eritrocitos de rata hay inhibición de 1:32 a 1:8 con glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina; de 1:32 a 1:16

con lactosa y manosa. Con arabinosa no hay inhibición. (Ver figura 9)

La glucosa inhibe de 1:16 a 1:4 la aglutinación de los eritrocitos de conejo; galactosa, N-acetilglucosamina de 1:16 a 1:4 y lactosa, arabinosa y manosa no inhiben. (Ver figura 10)

Usando eritrocitos de cobayo, se observa que hay inhibición de 1:8 a 1:4 usando lactosa y galactosa, y no se observa inhibición con arabinosa, manosa, glucosa y N-acetilglucosamina. (Ver figura 11)

Para este grupo de eritrocitos no se encontro un carbohidrato que inhibiera eficientemente la aglutinación, lo que nos puede indicar que ninguno de los azúcares probados se encuentran sobre la superficie del eritrocito, o no se encuentran lo suficientemente accesibles para ser reconocidos por las lectinas.

TABLA I
Pruebas de aglutinación con eritrocitos de
distintas especies.

AGLUTINACION POSITIVA		AGLUTINACION NEGATIVA
A	TITULO 1:16	Cabra
B	1:16	Borrego
O	1:8	Guajolote
Ratón	1:256	Gorrión
Rata	1:32	Carnero
Conejo	1:16	
Cobayo	1:8	
Rana	1:4	
Pez	1:2	

Los títulos se obtuvieron en placas de microtitulador.

Hemaglutinación usando hemolinfa absorbida con distintos eritrocitos al 10 %.

		Hemolinfa absorbida con eritrocitos						
Eritrocitos de Prueba		A	B	O	M	R	Cn	Cb
A	A	-	-	-	+	+	-	-
	B	-	-	-	+	+	-	-
	O	-	-	-	+	+	-	-
	M	+	+	-	-	-	+	-
	R	-	+	+	+	-	+	-
	Cn	-	+	+	+	+	-	+
	Cb	+	+	+	+	+	-	-
Hemolinfa sin Tratamiento		+	+	+	+	+	+	+
Albúmina al 1 % en S.S.		-	-	-	-	-	-	-

A, B y O = Grupos sanguíneos humanos.

M= Ratón

R= Rata

Cn= Conejo

Cb= Cobayo

+ = Aglutinación

- = No aglutinación

TABLA 3

Hemaglutinación usando hemolinfa absorbida con distintos eritrocitos al 50 %.

		Hemolinfa absorbida con eritrocitos						
		A	B	O	M	R	Cn	Cb
Eritrocitos de Prueba	A	-	-	-	+	+	-	-
	B	-	-	-	+	+	-	-
	O	-	-	-	+	+	-	-
	M	-	-	-	-	-	+	-
	R	-	-	-	-	-	+	-
	Cn	-	-	-	+	+	-	-
	Cb	-	-	-	+	+	-	-
Hemolinfa sin Tratamiento		+	+	+	+	+	+	+
Albumina al 1% en S.S.		-	-	-	-	-	-	-

A, B y O = Grupos sanguíneos humanos.

M = Ratón.

R = Rata.

Cn = Conejo.

Cb = Cobayo

+ = Aglutinación.

- = No aglutinación.

Hemaglutinación usando hemolinfa absorbida con eritrocitos al 100 %.

Eritrocitos de Prueba	Hemolinfa absorbida con eritrocitos						
	A	B	O	M	R	Cn	Cb
A	-	-	-	+	+	-	-
B	-	-	-	+	+	-	-
O	-	-	-	+	+	-	-
M	-	-	-	-	-	+	-
R	-	-	-	-	-	+	-
Cn	-	-	-	+	+	-	-
Cb	-	-	-	+	+	-	-
Hemolinfa sin Tratamiento	+	+	+	+	+	+	+
Albúmina al 1% en S.S.	-	-	-	-	-	-	-

A, B y O = Grupos sanguíneos humanos.

M = Ratón.

R = Rata.

Cn = Conejo.

Cb = Cobayo.

+ = Aglutinación.

- = No aglutinación.

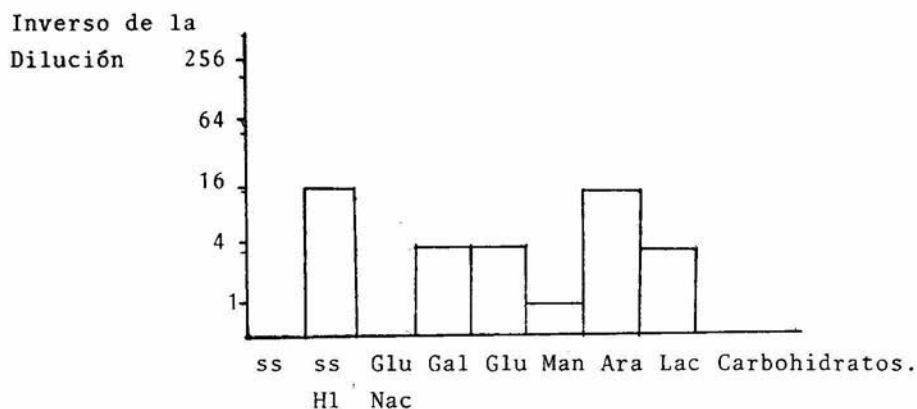


Figura 5. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrócitos humanos tipo A por diversos carbohidratos.

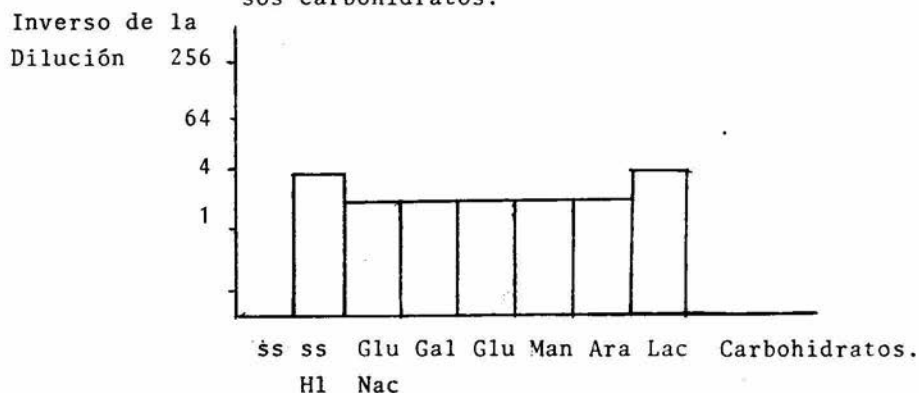


Figura 6. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos humanos tipo B por diversos Carbohidratos.

ss= Sol. salina. H1= Hemolinfa Lac= Lactosa Ara= Arabinosa
 Man= Manosa Glu= Glucosa Gal= Galactosa GluNac= N-Acetil
 glucosamina.

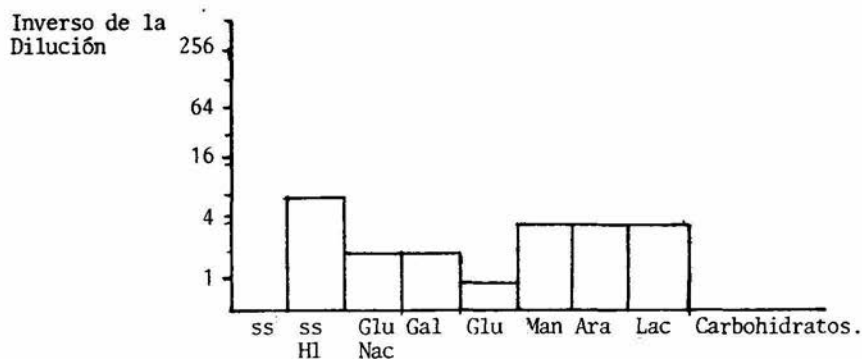


Figura 7. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos humanos Tipo 0 por diversos Carbohidratos.

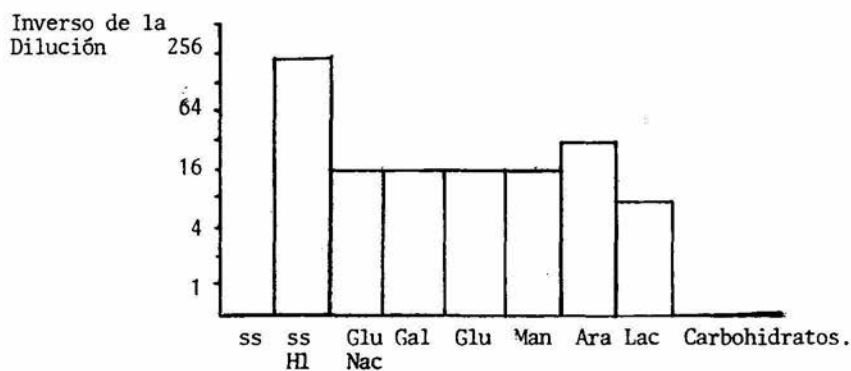


Figura 8. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos de ratón por diversos Carbohidratos.

ss= Sol. salina. HI= Hemolinfa Lac= Lactosa Ara= Arabinosa
 Man= Manosa Glu= Glucosa Gal= Galactosa GluNac= N-Acetilglucosamina.

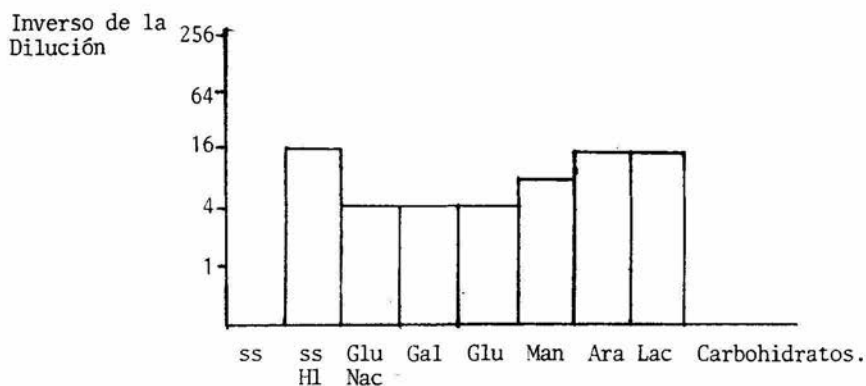


Figura 9. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos de rata por diversos carbohidratos.

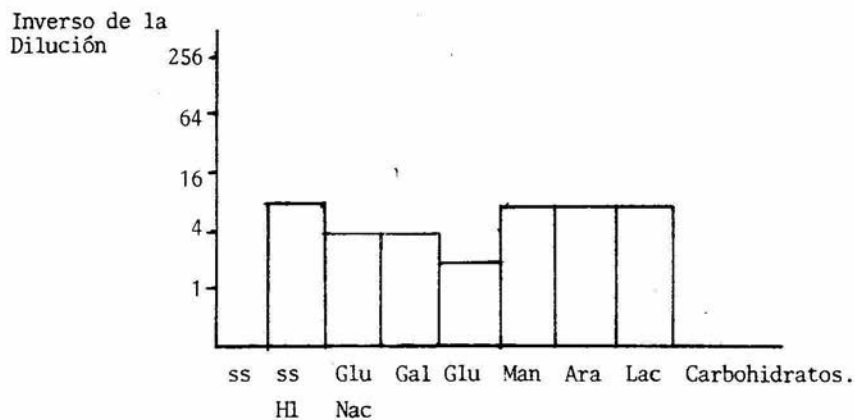


Figura 10. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos de conejo por diversos carbohidratos.

ss= Sol. salina HI= Hemolinfa Lac= Lactosa Ara= Arabinosa
 Man= Manosa Glu= Glucosa Gal= Galactosa GluNac= N-Acetilglucosamina.

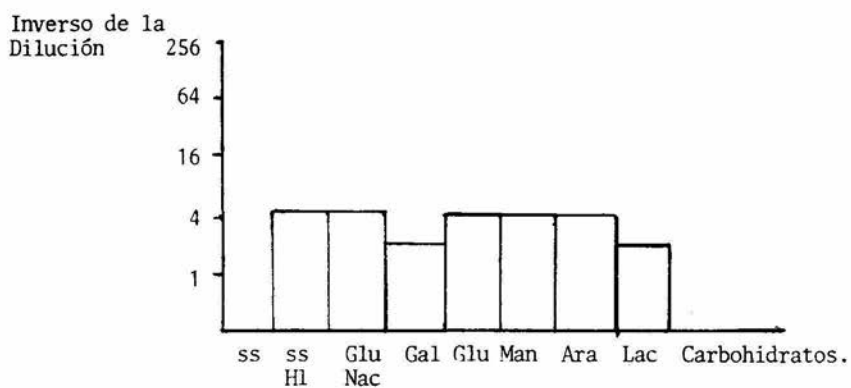


Figura 11. Histograma de la inhibición de la aglutinación de eritrocitos de ~~cobayo~~ ^{cobayo} por diversos carbohidratos.

ss= Sol. salina HI= Hemolinfa Lac = Lactosa Ara= Arabinosa
 Man= Manosa Glu= Glucosa Gal= Galactosa GluNac= N-Acetilglucosamina.

5.0 DISCUSION.

Los resultados muestran que en la hemolinfa del acocil Procambarus clarkki se encuentran sustancias capaces de aglutinar con distinta intensidad eritrocitos de varias especies probadas. Esta capacidad de aglutinar eritrocitos y verse inhibida con carbohidratos sugiere que se trata de una lectina.

En las especies en las que no hubo aglutinación fué probablemente por la ausencia de carbohidratos reconocibles por las lectinas, o por componentes presentes en la membrana de los eritrocitos que bloquearon la unión de las lectinas.

Los títulos obtenidos fueron bajos (1:2 a 1:256), en relación a los reportados para las lectinas obtenidas de Limulus polyphemus y Helix lactea, los cuales son mayores 1:8000 . Estos resultados corroboran lo observado por otros investigadores , quienes han observado que los títulos son generalmente menores de 1:500 (40).

Sin embargo, aunque no existe una explicación clara de la obtención de títulos tan altos en estas dos especies, probablemente en la hemolinfa de estos animales las lectinas estén relacionadas con el sistema de la coagulación y esto permita la interacción de otros factores aumentando los títulos de aglutinación (49, 50).

En la búsqueda del número de lectinas en otros invertebrados, se realizan pruebas de absorciones con eritrocitos preparados a bajas concentraciones (10 % o 4 %), y es probable que queden lectinas libres en la hemolinfa y los resultados obtenidos de esta manera no sean interpretados debidamente.

Pensando en comprobar la eficiencia de las absorciones al 50 y 100 %, se realizarón algunas pruebas de reabsorciones, las cuales consisten en tomar la hemolinfa absorbida y libre de eritrocitos, y volverla a colocar en presencia de la misma especie de eritrocitos con los cuales fué absorbida. Los resultados fuerón los mismos, la

hemolinfa reabsorbida continua aglutinando eritrocitos de la misma manera que la hemolinfa absorbida.

La hemolinfa reabsorbida con eritrocitos de ratón, rata y cobayo, sorprendentemente, no solo es capaz de aglutinar, sino tambien de coagularse, siendo que la hemolinfa obtenida para las pruebas de hemaglutinación y absorciones no coagula por sí misma.

Cenini, en 1983 (15), encontro que las lisinas de Eisenia fetida y Tropis canciformis actuan solo cuando las aglutininas han sido eliminadas por absorción con eritrocitos. Al parecer las aglutininas inhiben la actividad lítica, después de la adherencia de las aglutininas a los eritrocitos y su eliminación por centrifugacion, los sobrenadantes pueden actuar y lisar los eritrocitos.

Es probable que en la hemolinfa reabsorbida de P. clarkii libre de aglutininas , puedan actuar componentes capaces de coagularla . Las lectinas pueden tener mayor afinidad por los eritrocitos, y al ser eliminadas pueden actuar los componentes capaces de coagular la hemolinfa.

Con los resultados obtenidos en estos ensayos es posible plantear dos alternativas :

a) El no eliminar al 100 % la capacidad hemaglutinante sugiere la existencia de mas de una lectina diferente o diferentes estructuras de reconocimiento sobre una misma molécula.

b) Es probable que las estructuras de reconocimiento sobre los eritrocitos sean parecidos pero varien en densidad.

En gran numero de crustáceos se ha determinado la presencia de aglutininas, pero en pocos se ha determinado el número de las mismas. Solo en Calinectes sapidus (39), Homarus americanus (4), y Macrobrachium rosenbergii (5).

La especificidad por carbohidratos también ha sido ampliamente estudiada en invertebrados, pero en crustáceos han sido pocos los estudios. En Homarus americanus se ha demostrado la presencia de 2 lectinas con especificidad para N-acetilneuroaminico y N-acetil-D-galctosamina (26). Para

Macrobrachium rosenbergii se observó especificidad para el N-acetilneururaminico y sialolactosa (54).

En el presente trabajo se observó una eficiente inhibición con N-acetil-D-Glucosamina para eritrocitos A y O. El principal determinante para eritrocitos humanos tipo A es N-acetil D -galactosamina, sin embargo independientemente de la especificidad, dentro del sistema de grupos sanguíneos A B O, cada macromolécula contiene los azúcares L-Fucosa, D-Galactosa, N-Acetil-D-glucosamina N-acetil-D-galactosamina y aproximadamente 15 aminoácidos que lo unen a la membrana del eritrocito. Probablemente, alguna de las lectinas del acocil reconoce a N-acetil-D- glucosamina de la cadena precursora.

En los eritrocitos humanos tipo B, también se encuentra la N-acetilglucosamina, pero es probable que quede bloqueada por distintos componentes, por lo tanto la lectina no puede actuar sobre ellos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la N-acetilglucosamina se encuentre distribuida sobre la membrana del eritrocito sin pertenecer propiamente a los determinantes de grupo sanguíneo.

La glucosa también resulta un buen inhibidor de la aglutinación para eritrocitos tipo O, y la manosa para eritrocitos tipo A; pero ni la glucosa ni la manosa se encuentran formando parte de la cadena precursora para grupos sanguíneos, pero se pueden encontrar en la superficie del eritrocito.

La inhibición con estos azúcares no es tan eficaz, probablemente las lectinas no tengan esta especificidad o su afinidad es menor, pero pueden reaccionar con estos azúcares.

Para los eritrocitos de ratón, rata, conejo y cobayo no se encontró un azúcar que inhiba eficientemente, solo con eritrocitos de conejo la glucosa inhibe parcialmente.

En gran número de invertebrados se han encontrado varias lectinas dirigidas contra la N-acetilglucosamina (29), pero no ha sido reportada en ningún crustáceo lectinas contra este azúcar. La manosa no ha sido reportada en ningún invertebrado. En el caso de P. clarkii, la manosa no inhibe totalmente la función, pero es probable que exista una lectina dirigida contra este azúcar.

En muchos moluscos se han encontrado lectinas contra la N -acetilglucosamina, que reconoce a eritrocitos humanos tipo A, sin embargo solo la lectina de Helix pomatia ha sido purificada y comercializada.

Parish en 1977 (38), propone que los factores de reconocimiento en invertebrados son o están compuestos de glicosil transferasas, que usan los invertebrados para la síntesis y transporte de sus propios carbohidratos.

Estos factores de reconocimiento están formados de subunidades, lo cual coincide con el conocimiento actual de las lectinas de invertebrados, los cuales son secretados por los hemocitos a la hemolinfa y se asocian azarosamente en forma de hexameros. Estos tendrían una unidad citofílica la cual se uniría a la superficie del hemocito. Al reconocer carbohidratos de las partículas extrañas funcionarían como moléculas opsonizantes y facilitarían su eliminación.

Estos datos son interesantes, debido a que es probable la presencia de lectinas en P. clarkii que reconozcan N-acetilglucosamina, que a su vez es la unidad estructural

de la quitina y haria pensar que su papel no solo este confinado al reconocimiento de partículas extrañas.

Este trabajo es un primer acercamiento en la búsqueda de lectinas en el acocil P. clarkii, pero orientara en la purificación de la o las lectinas y nos permitira a futuro continuar con el análisis del papel biológico de las mismas.

CONCLUSIONES.

- 1.- En la hemolinfa del acocil P. clarkii se encuentran lectinas capaces de aglutinar eritrocitos de distintas especies.
- 2.- De acuerdo a los patrones de aglutinación, es probable que en la hemolinfa se encuentre más de una lectina.
- 3.- Las pruebas de inhibición sugieren especificidad para N-Acetilglucosamina, lactosa y manosa.

7.0 BIBLIOGRAFIA

1) Amirante, G.A. y Mazzalai, F.G. Synthesis and localization of hemagglutinins in hemocytes of the cockroach Leucophaea maderae L. Dev. Comp. Immunol. 2 : 735. (1985).

2) Aston, W.P. y Chadwick, J.S. Time and dose studies of the effect of cobra venom factor on the in vivo immune response in Galleria mellonella to Pseudomona aeruginosa. Dev. Comp Immunol. 2: 425. (1978).

3) Aston, W.P. y Chadwick, J.S. The inhibitory effect of purified cobra venom factor, isolated from the venom of Maja Naja atra, on the in vivo immune response in Galle melonella. Dev. Comp. Immunol. 5 : 353. (1981).

4) Bang, F.B. Serological responses among invertebrates other than insects. Fed. Proc. 26 : 1680. (1967).

5) Barnes, R.D. Zoología de los invertebrados. Ed. Interamericana. Mexico, D.F. pp 104-110. (1984).

6) Bertheussen, K. y Seljelid, R. Receptors for complement on echinoid phagocytes. I The opsonic effect of vertebrate sera on echinoid phagocytosis. Dev. Comp. Immunol. 6 : 423. (1982).

- 7) Bertheussen, K. Receptors for complement on echinoid phagocytes. II Purified human complement mediates echinoid phagocytosis. *Dev.Comp.Immunol.* 6 : 635. (1982).
- 8) Bertheussen, K. Complement-like activity in sea urchin coelomic fluid. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 21. (1983).
- 9) Bertheussen, K. Complement and lysins in invertebrates. *Dev.Comp.Immunol.* Supplement 3 : 173. (1984).
- 10) Bird, G.W.G. Invertebrate agglutinins in general. *Ann.N.Y. Acad. Sci.* 234 : 51. (1974).
- 11) Boyd, W.C;Brown, R; y Boyd, L.G. Agglutinins to human erythrocytes in mollusks. *J.Immunol.* 96 :301. (1962).
- 12) Branhi, Z; y Cooper, E.L. Characteristics of the agglutinin in the scorpion Androctonus australis. *Contemp.Top.Immunobiol.* 4 : 261. (1974).
- 13) Buscena,M. y Van de Vyver, G. Variability of allograft rejection processes in Axinella verrucosa. *Dev. Comp. Immunol.* 7:613. (1983).
- 14) Cameron, J.N. La muda del cangrejo azul. *Investigacion y Ciencia.* 106 : 50. (1985).

- 15) Cenini, P. Comparative studies on hemagglutinins and hemolysins in an annelid and a primitive crustacean. Dev. Comp. Immuno. 7 : 637. (1983).
- 16) Cooper, E.L. Immunity in invertebrates. Critical Reviews in Immunology. 2 : 1. (1981).
- 17) Cooper, E.L. Rejection of body wall Xenografts exchanged between Lumbricus terrestris and Eisenia foetida. Am.Zool. 15 : 169. (1965).
- 18) Cooper, E.L. Specific tissue graft rejection in earthworms. Science. 166 : 1414. (1969).
- 19) Cornick, J.W. y Stewart, J.E. Partial characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the lobster, Homarus americanus. J. Invert. Pathol. 21 : 255. (1973).
- 20) Diener, E. y Marchalonis, J. J. Cellular and humoral aspects of the primary immune response of the toad Bufo marinus. Immunology. 18 : 279 . (1970).
- 21) Feng, S.Y. Experimental bacterial infections in the oyster Crassostrea virginica. J. Invert. Pathol. 8 : 505. (1966).

- 22) Feng, S.Y. Lysozime-like activities in the hemolymph of Crassostrea virginica. Contemp. Top. Immunobiol. 4 :225. (1974).
- 23) Fernandez-Moran, H; Marchalonis, J.J. y Edelman, G. M. Electron microscopy of a hemagglutinin from Limulus polyphemus . J. Mol. Biol. 32 : 467.(1968).
- 24) Fingerman, M. Evolucion y diversidad zoologicas. Ed. Interamericana. Mexico, D. F. pp 1-24 (1972).
- 25) Fuke, M.T. y Numakunai, T. Allogenic cellular reaction between intra-specific types of a solitary ascidian, Halocynthia rorezi. Dev. Comp. Immunol. 6 : 253. (1982).
- 26) Hall, J.L. y Rowlands, D.T., J.R. Heterogeneity of lobster agglutinins I. Purification and Physicochemical characterization. Biochem. 13: 821. (1974).
- 27) Hildeman, W.H. y Reddy, A.L. Phylogeny of immune responsiveness : Marine invertebrates. Fed. Proc. 32 : 2188. (1973).
- 28) Hildeman, W. H.; Dix, T.G.; y Collins, J.A. Tissue transplantation in diverse marine invertebrates. Contemp. Top. Immunobiol. 4 : 141. (1974).

- 29) Ishiyama, I.; Dietz, W y Uhlebruck, G. Comparative studies of anti-A agglutinins from various snails of the genus Helix. Comp. Biochem. Physiol. 44 : 529. (1973).
- 30) Koch, C. y Nielsen, H. Activation of vertebrate complement by Helix pomatia hemplymph. Dev. Comp. Immunol. 8 : 15. 1984).
- 31) Lackie, A.M. Immunological recognition of cuticular transplants in insects. Dev. Comp. Immunol. 7 : 41. (1983).
- 32) Langlet, C. y Bierne, J. Experimental evidence for cell mediated immune response to incompatible graft in Lineus (Nemertea). Dev. Comp. Immunol. 7 : 617. (1983).
- 33) Manning, J.M. y Turner, R. J. Comparative Immunobiology. Halted Press. USA. pp 29-30. (1976).
- 34) Manning, J.M. y Turner, R. J. Comparative Immunobiology. Halted Press. USA. pp. 41-44. (1976).
- 35) Maramorosch, K. y Shope, R. Invertebrate Immunity. Academic Press. New York, USA. pp 202-210. (1975).
- 36) Marchalonis, J.J. Immunity in evolution. Harvard University Press, Cambridge Massachusetts, USA. pp 45-48. (1977).

- 37) Marchalonis, J.J. y Edelman, G. M. Isolation and characterization of a hemagglutinin from Limulus polyphemus. J. Mol. Biol. 32 : 453. (1968).
- 38) Parish, C.R. Simple model for self non-self discrimination in invertebrates. Nature. 267 : 711. (1977).
- 39) Pauley, G. B. Comparasion of a natural agglutinin in the hemolymph of the blue crab, Callinectes sapidus, with agglutinins of other invertebrates. Contemp. Top. Immunobiol. 4 : 241. (1974).
- 40) Pauley, G.B.; Granger, G.A. y Krassner, S. M. Characterization of a natural agglutinin in the hemolymph of the californnia sea hare, Aplysia californica. J. Invert. Pathol. 18 : 207. (1971).
- 41) Poinar, G.O. Insect Immunity to parasitic nematodes. Contemp. Top. Immunobiol. 4 : 167. (1974).
- 42) Prowse, R.H. y Tait, N.N. In vitro Phagocytosis by amebocytes from the hemolymph of Helix aspersa (Muller). Immunology. 17 : 437. (1969).

- 43) Ratanarat-Brockelman, C. Isolation of nematode inhibitor from hemolymph of the snail, Helix aspersa. Biol Bull. 152 406 (1977).
- 44) Ratcliffe, N.A. Invertebrate Immunity - A primer for the non specialist. Immunol. Lett. 10 : 253. (1985).
- 45) Renwartz, L. Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defense reactions : The immuno Biological importance of carbohydrate specific binding molecules. Dev. Comp. Immunol. 7 : 603. (1983).
- 46) Ryoyama, K. Studies on the biological properties of celomic fluid of sea urchin. II Naturally occurring hemagglutinin in sea urchin. Biol. Bull. 146 : 404. (1974).
- 47) Roguer, W. y Uhlenbrunck, G. Invertebrate lectins : The biological role of a biological rule. Dev. Comp. Immunol. Supplement 3 : 159. (1984).
- 48) Sharon, N. Lectins. Scientific American. 236 : 108. (1977)
- 49) Soderhall, K. Fungal cell wall beta 1,3 - glucans induce clotting and phenoloxisase attachment to foreing surface of

crayfish hemocyte lysate. Dev. Comp. Immunol. 5 : 565. (1981).

50) Soderhall, K. Prophenoloxidase activating system and melanization - A recognition mechanism of arthropods ?. A review. Dev. Comp. Immunol. 6 : 601. (1982).

51) Tartar, V. Transplantation in protozoa. Transp. Proc. 2 : 183. (1970).

52) Thomas, J.G.; Ratcliffe, N.A. Integumental grafting immunorecognition in insects. Dev. Comp. Immunol. 6 : 643. (1982).

53) Tyson C.J. Recognition of foreignness in the fresh water crayfish, Parachanna bicarinatus. Contemp. Top. Immunobiol. 4 : 159. (1974).

54) Vasta, G.R. y Cohen, E. The specificity of Centruroides sculpturatus Ewin (Arizona lethal scorpion) hemolymph agglutinins. Dev. Comp. Immunol. 6 : 219. (1982).

55) Villee, C.A. Biologia. 7a ed. Ed. Interamericana. Mexico, D.F. pp. 240-242. (1985).

56) Yeaton, R.W. Invertebrate lectins : I. Ocurrance. Dev. Comp. Immunol. 5 : 391. (1981).

57) Yeaton, R.W. Invertebrate lectins : II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. Dev. Comp. Immunol. 5 : 535. (1981).