

03082

6
Zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Postgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
Instituto de Investigaciones Biomédicas

SISTEMA DE DEFENSA DEL CAMARON CAFE (*Penaeus californiensis*)

T E S I S

Que para obtener el Grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

p r e s e n t a

A. FRANCISCO VARGAS ALBORES

Comite Tutorial: Dr. José Luis Ochoa
Dr. Pablo Pérez-Gavilán
Dr. Edgar Zenteno

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN 1992

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

* Contenido *

INTRODUCCION.	1
Antecedentes y Panorama.	1
Inmunidad de Invertebrados.	2
Las Lectinas.	4
El Sistema Profenoloxidasa.	5
Los Hemocitos.	6
Objetivos	7
MATERIALES Y METODOS.	9
Reactivos.	9
Soluciones.	9
Animales.	9
Extracción de la Hemolinfa.	9
Obtención del Plasma.	9
Obtención de las Células.	9
Medición de osmolalidad, pH, Na y K.	10
Análisis Químicos.	10
Eritrocitos.	10
Hemaglutinación.	10
Inhibición de la Hemaglutinación.	10
Desialización de la fetufna.	10
Purificación de la Aglutinina.	11
Electroforesis.	11
Determinación del Peso Molecular.	11
Bacterias.	11
Aglutinación de Bacterias.	11
Sedimentación de Bacterias.	11
Determinación de la Fenoloxidasa.	12
Preparaciones.	12
Fagocitosis.	12

RESULTADOS Y DISCUSION.	13
Solución Salina Isotónica para Camarones.	13
Obtención y Manejo de las Muestras.	13
Detección y Localización del Sistema profenoloxidasa.	13
Detección de la Actividad Hemaglutinante.	15
Purificación.	16
Determinación del Peso Molecular.	18
Inhibición de la Hemaglutinación.	19
Interacción con Bacterias.	20
Los Hemocitos.	22
Microscopia de Contraste de Fase.	22
Tinción de los Hemocitos.	23
Fagocitosis.	25
 CONCLUSION.	 27
 BIBLIOGRAFIA.	 29
 PRODUCCION CIENTIFICA.	 33
 APENDICES	 34

INTRODUCCION.

Antecedentes y Panorama.

Dentro de la explotación de los recursos marinos, la captura y comercialización del camarón es una de las actividades económicas más rentables. En nuestro país, el volumen promedio anual manejado en los últimos años se ha mantenido en 75,000 toneladas. De igual modo, la exportaciones mexicanas de éste recurso no han sufrido modificaciones importantes, prevaleciendo las 35,000 toneladas anuales, que significan para México un ingreso de divisas alrededor de 400,000 dólares por año.

Nuestro principal mercado, los Estados Unidos, sigue demandando este recurso como se demuestra por el incremento en sus importaciones de 60,782 toneladas en 1982, 116,799 en 1986 y casi las 200,000 en 1990. Sin embargo, México se ha mantenido con un promedio de 35,000 toneladas puestas en el mercado estadounidense, lo que significa haber pasado del 56.8% de participación en 1980, al 28.9% en 1986. Es importante señalar que los otros países participantes de las importaciones estadounidenses mantienen un programa activo de cultivo del camarón, lo que les ha permitido aventajar al nuestro en el mercado del país vecino. La saturación de la capacidad de la flota camaronera y el atractivo mercado norteamericano están estimulando en México el cultivo del camarón, perfilándose como una actividad productiva de gran importancia económica.

La contraparte radica en que el cultivo de camarón es una actividad de alto riesgo debido, fundamentalmente, a la aparición y diseminación de enfermedades que llegan a afectar seriamente la producción. Aunque mucho se ha avanzado en el conocimiento de los parámetros ambientales de los cultivos y en la identificación de organismos que los afectan, la presencia de padecimientos infecciosos sigue siendo un problema en acuicultura debido a la

ausencia de metodología para un diagnóstico temprano y de tratamientos eficientes. En la actualidad, los sistemas de vigilancia del contenido biótico del cultivo se fundamentan en el análisis cualitativo y cuantitativo de los posibles patógenos, ya sea en el cuerpo de agua, en el cuerpo del animal o en ambos. Los protocolos incluyen, además del muestreo del agua, el diagnóstico macroscópico, sacrificio y, de ser necesario, la toma de muestras de las lesiones. Desafortunadamente, cuando se detecta un animal infectado, es probable que parte de la población cultivada ya está afectada.

En los cultivos intensivos, el desarrollo y la transmisión de patógenos es altamente peligrosa [1, 2] debido a la alta densidad de población, por lo que es necesario el reconocimiento, la prevención y el tratamiento temprano de muchas enfermedades contagiosas. Debe señalarse que en cultivos intensivos, el conocimiento de los padecimientos, su etiología, forma de transmisión, diagnóstico y tratamiento tempranos, se traducen en incentivos económicos ya que permiten mantener las enfermedades bajo control [3, 4].

El control del número de microorganismos, además del uso de antibióticos [5], se basa en la regulación de las características del agua. Esta metodología, si bien puede controlar parcial y momentáneamente el problema infeccioso, no permite conocer la condición de salud de la población cultivada y nuevos cuadros infecciosos podrían presentarse. Por otra parte, la detección de patógenos en el estanque no implica necesariamente que se vaya a establecer un proceso infeccioso. Muchas infecciones, principalmente de origen bacteriano, son de etiología secundaria y concurren en síndromes como: deficiencia de ácido ascórbico, toxinas, heridas y estrés extremo [6, 7]. Adicionalmente, algunos microorganismos considerados epicomensales pueden llegar a causar serios

padecimientos en cultivos cuando el estado de salud de los camarones no es adecuado [8, 9].

De este modo, parece ser que el establecimiento de un cuadro infeccioso en el cultivo no se debe únicamente a un incremento numérico de los patógenos, sino que es altamente dependiente de la condición fisiológica de los animales. Además, cuando se implementa un tratamiento para disminuir el número de patógenos, generalmente se modifican también las características físicas y químicas del estanque y la conducta de la biota total del estanque. Esto implica que además se modifique la condición fisiológica de los camarones [10, 11], lo cual puede reflejarse en la disminución del crecimiento, estrés y muda [12, 13], impactando directamente en la productividad.

Hasta la fecha no se conoce una metodología precisa capaz de definir el estado de susceptibilidad de los camarones hacia las infecciones. De poderse desarrollar se tendría la ventaja de regular paulatinamente las condiciones del estanque, evitando el estrés de los animales y la aparición de la enfermedad.

El primer paso para llegar a un diagnóstico rápido, preciso y oportuno es, sin lugar a dudas, la determinación de aquellos componentes del sistema de defensa de los camarones que pudieran verse modificados por la presencia de patógenos ó aquellos que al afectarse en sus niveles y/o actividad permitan el establecimiento de una infección. En lo que se refiere a los camarones y en especial al camarón café (*Penaeus californiensis*) no existe información sobre los elementos que participan en los mecanismos de defensa. Es por eso que, apoyándose en los antecedentes reportados para otras especies de invertebrados y en el contexto de la inmunidad de invertebrados, el presente trabajo describe los elementos que, por sus características, permiten suponer que participan en los mecanismos de defensa de los camarones. Por ello, se recopilan y revisan los antecedentes sobre la inmunidad de inverte-

brados, las lectinas, el sistema fenoloxidasa y las células con actividad fagocítica.

Inmunidad de Invertebrados.

El término "inmunidad de invertebrados" deberá de ser utilizado, y entendido, en un sentido más amplio, ya que no necesariamente involucra memoria específica, acelerado rechazo de un segundo implante, o un marcado incremento de la concentración de algún componente sérico, bajo un estímulo, como ha sido detectado en los vertebrados. Comparado con el sistema inmune de los mamíferos, el sistema protector de los invertebrados parece ser primitivo debido a pérdida de diversidad en especificidad química y reacciones con epítopes, ausencia de inmunoglobulinas y memoria relativamente de corto tiempo. Sin embargo, en forma general deberá de hablarse de que un organismo posee sistema inmune si es capaz de establecer una respuesta protectora en contra de agentes extraños como: virus, bacterias, parásitos, células envejecidas o dañadas.

Además, al discutir los mecanismos de defensa de invertebrados, debe considerarse la diversidad que poseen estos grupos de animales y sus relaciones filogenéticas, ya que dentro de los invertebrados se incluyen una gran variedad de especies animales, desde los protozoarios unicelulares a los más complejos equinodermos y protocordatos. Por ejemplo la cacerola de mar (*Limulus*) y la cucaracha (*Periplaneta*), aunque ambos son artrópodos, posiblemente estén separados evolutivamente igual ó mas que los peces y los mamíferos. Así, las observaciones aplicables para una especie, no necesariamente son aplicables para la otra. Por otra parte, aunque algunos invertebrados actuales poseen mecanismos protectores utilizados por sus ancestros, muchos organismos tienen sistemas que difieren del original por las modificaciones adquiridas y que varían de acuerdo a la historia natural de cada especie animal. Además, la posibilidad de evolución convergente no deberá ser perdida de vista, por lo que las sugerencias de homología, en ausencia de datos genéticos, son muy arriesga-

das. Por otro lado, sin embargo, existen ciertos fenómenos y/o componentes, como son las células fagocíticas, que parecen ser conservados a través de la evolución y están presentes en todos los organismos vertebrados e invertebrados.

Aún cuando es posible encontrar antes de 1980 literatura en donde se refiere y analiza la "inmunidad de invertebrados" [14], el término y su validez seguan siendo discutidos [15]. Sin embargo, a partir de 1983-1985, el término, concepto y existencia de un sistema inmune en los invertebrados es totalmente aceptado, revisado y explicado en diversas áreas [16-33]. Así, a partir de estas fechas el reconocimiento de la importancia de la inmunidad de invertebrados se ha incrementado y su estudio se ha estimulado debido a dos razones fundamentales: La primera involucra un interés puramente científico, ya que los invertebrados comprenden el 95% de todas las especies conocidas en el reino animal, por lo que muchos trabajos están encaminados a la posibilidad de descubrir nuevos mecanismos de defensa, aún no detectados en los sistemas inmunológicos de vertebrados. Además, el entender los sistemas de defensa de estos animales "simples" puede proporcionar bases para conocer el origen de la inmunidad de vertebrados y llegar a unificar conceptos para la inmunología.

La segunda incluye aspectos más prácticos, como son: el control de plagas, transmisión de enfermedades y los cultivos comerciales. Numerosos invertebrados, pero especialmente un gran número de las 750,000 especies conocidas de insectos, compiten con el hombre por sus productos agrícolas, forestales y animales. Muchas especies están llegando a ser resistentes a pesticidas químicos, algunos de los cuales se acumulan en niveles superiores de la cadena alimenticia. Por ello, y por la dificultad de desarrollar nuevos pesticidas debido a los altos costos de escalamiento, se ha propiciado el desarrollo del control microbiológico. Es aquí donde los estudios sobre mecanismos inmunológicos de invertebrados han tomado un nuevo significado, ya que, el conocimiento de la rela-

ción parásito/invertebrado, ayudaría a la optimización en el uso de los agentes de control biológico. En el caso de los invertebrados que actúan como vectores de enfermedades (p.e., tripanosomiasis, malaria, oncocercosis y esquistosomiasis), donde los parásitos invaden y se multiplican sin provocar en el vector una respuesta inmune efectiva o enfermedad aparente, el conocimiento del sistema inmune de estos organismos es fundamental. Por último, muchos invertebrados incluyendo los moluscos y crustáceos están siendo cultivados y un entendimiento de los mecanismos de defensa del huésped ayudaría a evitar la aparición de enfermedades que pueden ocurrir durante su cultivo, como es el caso del camarón.

El estudio de la inmunidad de invertebrados, sin embargo, se había visto dificultado por considerar a los organismos y a sus mecanismos de defensa de poca importancia, debido a la corta vida media, a la alta capacidad reproductora de éstos animales y por quererlos ver como una segunda clase de vertebrados e interpretar sus mecanismos de defensa en términos de inmunidad de vertebrados. Además, se encuentran las dificultades técnicas y metodológicas propias para su estudio, ya que debido a la gran diversidad de invertebrados, no debe ser sorpresa encontrar alguna variación considerable en el potencial inmunológico de éstos animales, y deben tomarse precauciones en los intentos para generalizar el trabajo realizado sobre algunas especies.

Centrando la atención en los artrópodos, se han descrito algunos componentes que participan en su sistema de defensa. En algunos casos, estos componentes presentan diferencias en sus formas y características, sin embargo mantienen una función similar. Para facilitar su comprensión y poder explicar su participación en los sistemas inmunes de los invertebrados, en las siguientes secciones se describe lo más sobresaliente de las aglutininas séricas o lectinas, el sistema fenoloxidasa y las células fagocíticas, haciendo énfasis, de acuerdo a la información viable, en los crustáceos.

Las Lectinas.

Las lectinas, también llamadas aglutininas o hemaglutininas, son proteínas polivalentes de origen animal o vegetal que se unen en forma específica y reversiblemente a carbohidratos [34-37], por lo que son capaces de precipitar glicoconjugados y aglutinar eritrocitos, bacterias y otras células que tengan la complementariedad requerida [37]. La unión es estabilizada por la hidrofobicidad, interacción de cargas y unión multivalente [37]. Estas proteínas han sido herramientas importantes en el estudio de glicoproteínas de la superficie celular y de sus modificaciones durante la diferenciación y transformación maligna [35]. Las lectinas han sido detectadas en extractos o fluidos por hemaglutinación y su especificidad demostrada por inhibición con carbohidratos.

Las primeras lectinas descritas son de origen vegetal, pero desde hace varias décadas se han detectado, y estudiado, lectinas presentes en la hemolinfa y extracto tisulares de animales invertebrados [38]. En algunos casos, solamente se ha detectado una lectina, mientras que en otros parecen existir varias entidades moleculares diferenciables por su estructura y/o especificidad [39]. Aunque la función exacta de las lectinas de invertebrados no se conoce, la presencia de estas proteínas, tanto en el suero [40] como en la superficie de las células fagocíticas [41] ha sugerido que éstas moléculas tienen un papel importante en los sistemas de defensa [16-21, 41, 42], a falta de una respuesta humoral caracterizada por inmunoglobulinas. Las aglutininas de los invertebrados por ser, cuando menos, divalentes tienen la capacidad de precipitar moléculas, aglutinar células, bacterias [43], virus [44] y protozoarios [45], facilitar la fagocitosis [19], ya sea por opsonización, o bien por localizarse en la superficie de hemocitos [20, 46, 47], reacciones similares que efectúan las inmunoglobulinas.

Además de su posible participación en los mecanismos de defensa, ampliamente revisado [16-21, 28, 38, 39], las aglutininas en los invertebrados se han visto involucradas en otros fe-

nómenos biológicos importantes, lo que ha dificultado establecer con precisión su(s) función(es). Sin embargo, es aceptado que estas moléculas participan en tres tipos de eventos [19, 48]: a) Reconocimiento de receptor, esencial para ciertos fenómenos de agregación celular y para los mecanismos de fertilización (interacción huevo-esperma); b) Reconocimiento y eliminación de glicoconjugados "viejos" o alterados, del propio organismo o de ciertos simbiontes; y c) Defensa y destrucción de moléculas, partículas y/o agentes extraños.

Pese a que lectinas de diferentes especies de invertebrados han sido purificadas, no se ha podido establecer una generalización sobre su estructura, especificidad, mecanismo y otras propiedades que podrían ayudar a comprender el papel de éstas proteínas en los sistemas de defensa. Esto se debe, principalmente, a la gran diversidad que presentan en sus propiedades moleculares y especificidad. Por otro lado, con frecuencia se ha reportado la presencia de múltiples lectinas en la hemolinfa de los invertebrados [38, 40, 42, 46, 49-57] y, en algunos casos, las diferencias no radican únicamente en la especificidad y estructura, sino que además muestran diferentes propiedades bioquímicas y actividades biológicas [58-60].

Aunque en forma análoga a las inmunoglobulinas en los vertebrados, las aglutininas en los invertebrados están involucradas en el reconocimiento y la discriminación de lo propio y lo extraño [16-21, 38, 39, 41, 46, 47, 61, 62], diferencias importantes pueden ser definidas. Mientras que las inmunoglobulinas presentan una estructura molecular similar, en las aglutininas de invertebrados no ha sido posible encontrar semejanzas que permitan hacer una generalización sobre las propiedades moleculares de éstas proteínas. Por otro lado, a diferencia de las inmunoglobulinas, la especificidad de las lectinas parece estar restringida a residuos sacáridos [38]. Sin embargo, uno de los puntos más controversiales está relacionado a la capacidad de inducción de la síntesis de las aglutininas. Aunque en algunos trabajos se han reportado modificaciones en la actividad y/o

concentración de la lectina sérica por la presencia de agentes patógenos [63-65], o por inoculación de eritrocitos [66], la inducción o estimulación no ha sido posible en la mayoría de los casos.

Por otro lado, si consideramos una analogía funcional con los anticuerpos, se espera que la aglutininas séricas de los invertebrados posean otras propiedades biológicas que permitan la eliminación del agentes patógenos. Afortunadamente, las aglutininas séricas de los invertebrados tienen un papel adicional en los sistemas de defensa relacionado con la fagocitosis a través del fenómeno de opsonización.

Las interacciones entre la célula fagocítica (hemocito) y un cuerpo extraño están mediadas por receptores, por lo que estas interacciones dependen de las reacciones entre los componentes de superficie de los hemocitos y las estructuras moleculares extrañas. En el caso de los macrófagos de vertebrados se ha determinado el papel de las glicoproteínas en la unión de bacterias a éstas células [67], y es posible que las lectinas funcionen en forma similar en el proceso de fagocitosis en invertebrados [20, 21].

La fagocitosis, junto con los factores humorales, forman la primera línea de defensa una vez iniciada la infección. Las células involucradas van desde las primitivas "limpiadoras" de los acelomatos, hasta los más especializados amebocitos de los invertebrados superiores. Los fagocitos de los invertebrados son capaces de ingerir virus, bacterias, protozoarios y hongos [68-70]. La ingestión depende, como en los vertebrados, de las características del agente invasor, de factores ambientales [71] y de factores séricos de reconocimiento [29].

Uno de los fenómenos que modifican la fagocitosis es la opsonización. El término opsonina es usado para denominar a factores séricos que actúan sobre partículas o células para incrementar su ingestión por las células

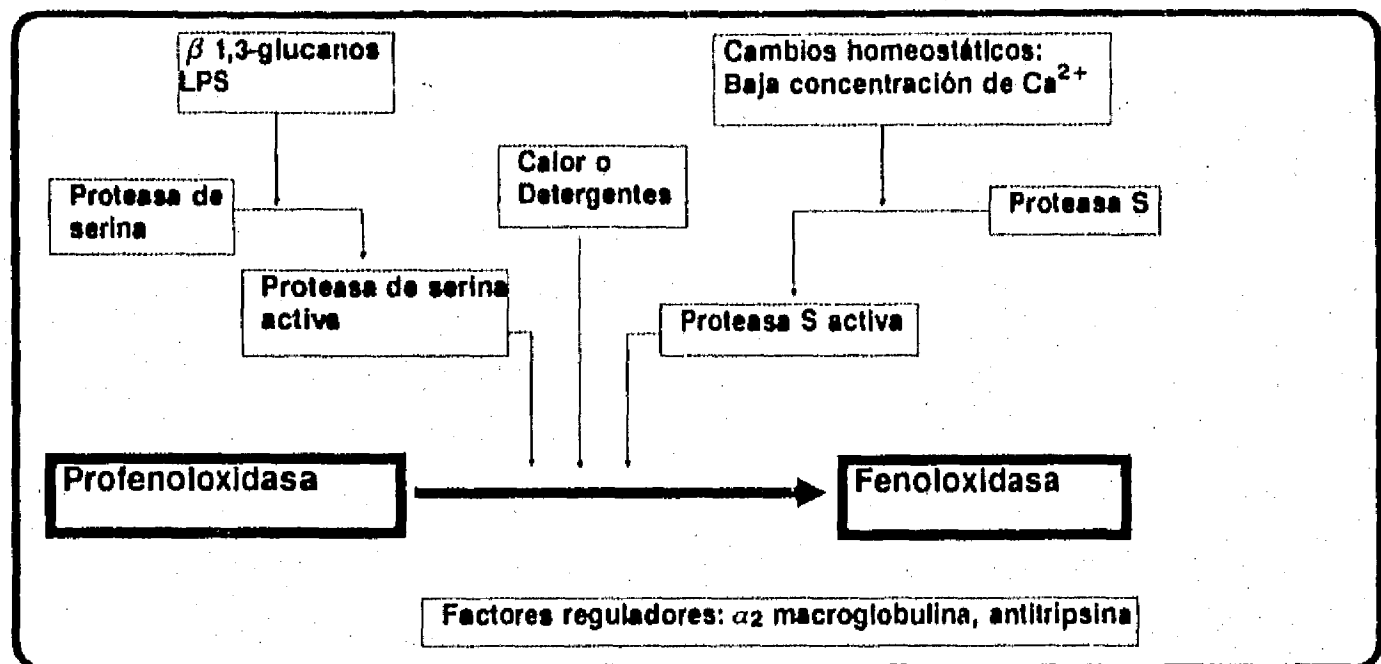
fagocíticas. De ésta forma, la opsonización proporciona una importante relación entre los mecanismos de defensa celular y humoral. Mientras que en los vertebrados las sustancias opsonizantes están representadas por los anticuerpos y algunos factores del sistema del complemento, en los invertebrados éste fenómeno es realizado por las lectinas séricas y productos del sistema profenoloxidasa (ver más adelante).

La estimulación de la fagocitosis promovida por las aglutininas como agentes opsonizantes ocurre únicamente si la lectina puede unirse al hemocito y a la célula blanco [72]. Esta estimulación de la fagocitosis por lectinas puede ser inhibida por azúcares específicos, demostrando que la interacción proteína-carbohidrato está involucrada en el mecanismo de reconocimiento. Además, los carbohidratos presentes en la superficie de los hemocitos representan sitios receptores para las opsoninas a los cuales el complejo partícula-opsonina puede unirse [20].

Aunque las aglutininas séricas tienen la capacidad de aglutinar, precipitar y facilitar la fagocitosis de partículas extrañas que aseguran su participación en el sistema de defensa de invertebrados, faltan evidencia que expliquen el mecanismo de reconocimiento, interacción y, sobre todo, la inducción de estas proteínas.

El Sistema Profenoloxidasa.

Dentro de las reacciones de defensa en invertebrados, con frecuencia se observa melanización. La enzima involucrada en la síntesis del pigmento de melanina es la fenoloxidasa (E.C. 1.10.3.1; o-difenol: oxígeno óxido-reductasa) la cual es capaz de oxidar los fenoles a quinonas, que posteriormente polimerizan en forma no enzimática a melanina. Este pigmento, junto con sus intermediarios, tiene propiedades fungistáticas, y ha sido descrita en la hemolinfa de artrópodos en forma de una proenzima inactiva [73], con peso molecular de 80 Kda [74], llamada profenoloxidasa (proPO).



Esquema de la activación del sistema profenoloxidasa en crustáceos. (Ratcliffe y cols., [29]).

El sistema activador de la proPO de artrópodos probablemente constituye un sistema de reconocimiento en estos animales [29, 75], el cual, una vez activado, genera algunos factores que involucran a los hemocitos para la eliminación de material extraño [29, 76, 77]. De este modo, además de su papel en la melanización, el sistema proPO está involucrado en algunas reacciones celulares de defensa como son: la fagocitosis, la formación de nódulos [29], la encapsulación [29, 78], la adhesión [68, 79] y locomoción de hemocitos [80].

El sistema proPO es activado por proteasas de serina, tanto en insectos [81-83] como en crustáceos [84, 85]. A su vez, estas proteasas de serina, que se encuentran en forma inactiva en los hemocitos, pueden ser activadas por la presencia de glucanos β -1,3 de hongos [82, 86-89], peptidoglicanos bacterianos [83] o lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas [29, 87, 90].

El conocimiento sobre la bioquímica de la activación de la proPO ha permitido aceptar la participación de éste sistema en la inmunidad de artrópodos. Se han encontrado una serie de

proteínas que intervienen en la activación de la proPO que desencadenan la llamada reacción en cascada. Un ejemplo es la glicoproteína de 91 Kda descrita en *Blaberus craniifer* la cual está involucrada en la activación del sistema proPO [91]. Esta proteína, por sí misma no induce la activación del sistema, no muestra actividad aglutinante, de fenoloxidasa ni de peptidasa y puede unirse a la laminarina [91].

Los Hemocitos.

Las células circulantes (hemocitos) de la hemolinfa de los crustáceos parecen estar involucradas en eventos fisiológicos importantes como son: reparación de heridas [92], fagocitosis y encapsulamiento [70, 93], coagulación [94] y otras [revisado en 95]. Sin embargo, pese a los múltiples intentos, no ha sido posible clasificar estas células y determinar la función de cada tipo. Desafortunadamente, cada estudio ha utilizado diferentes criterios y términos para definir a los diversos tipos de hemocitos [96].

Utilizando el camarón *Sicyonia ingentis* como un prototipo de crustáceo decápodo, se ha

propuesto una clasificación de los hemocitos, la cual permite correlacionar morfología celular, citoquímica y tres funciones esenciales: coagulación, fagocitosis y encapsulamiento [97-100]. Sin embargo, este esquema no ha podido ser aplicado para todos los crustáceos.

Con la ayuda de la microscopía electrónica, se ha podido definir a una población celular que participa en el proceso de coagulación, denominadas células hialinas, debido a que no poseen gránulos en su citoplasma. [99, 101]. Otra población celular está constituida por células largas que contienen numerosos gránulos citoplasmáticos pequeños ($0.4 \mu\text{m}$) o grandes ($0.8 \mu\text{m}$). Estas células no muestran cambios durante la coagulación, pero son capaces de fagocitar bacterias y encapsular hifas de hongos [100]. Se han observado diferencias funcionales dentro de los hemocitos granulares, de acuerdo al tamaño de sus gránulos. La fagocitosis es principalmente llevada a cabo por los hemocitos que contienen, además de gránulos citoplasmáticos pequeños, enzimas hidrolíticas, como son: fosfatasa ácida, β -glucuronidasa y esterasa [98]. Por su parte, el encapsulamiento es iniciado por hemocitos de gránulos grandes y después se involucran las células de gránulos pequeños [100]. La fenoloxidasa, enzima involucrada en la melanización del material encapsulado y posiblemente en el reconocimiento de lo extraño [80], es más abundante en los hemocitos de gránulos grandes que en aquellos de gránulos pequeños. En contraste, las células hialinas, las cuales no participan en la fagocitosis y encapsulamiento, no tienen proPO y rara vez contienen fosfatasa ácida [98]. Así, la división de los hemocitos de los decápodos en dos grupos puede ser sostenido por estudios morfológicos, citoquímicos y funcionales.

Objetivos.

Por todo lo anteriormente expuesto, al abordar el estudio de los componentes del sistema de defensa del camarón se consideró describir al menos un componente humoral y uno celular. Las aglutininas (lectinas) séricas, fueron seleccionadas como sujeto de estudio ya que existen evidencias que las ubican como moléculas responsables del reconocimiento de lo propio y extraño, participando en la eliminación de patógenos actuando como facilitadoras (opsoninas) de la fagocitosis y por aglutinación directa. Por su parte, el componente celular propuesto para su estudio se centró en aquellas células circulantes con capacidad fagocítica y en determinar si éste fenómeno puede ser estimulado por componentes séricos (la aglutinina, por ejemplo).

Al realizar los primeros experimentos, se hizo patente la necesidad de diseñar una solución isotónica para la obtención de hemolinfa sin afectar las células. Durante esta fase, se determinó también la presencia del sistema profenoloxidasa y su posible localización en la hemolinfa.

De este modo, el trabajo se constituye de tres partes perfectamente diferenciables por sus objetivos parciales, que en su conjunto demuestran la existencia de un sistema de defensa en los camarones y su interrelación, así como su eficiencia.

La primera parte está dirigida a la búsqueda de una solución isotónica y a la determinación del sistema profenoloxidasa; la segunda incluye la detección y purificación de una aglutinina sérica, la descripción de sus propiedades moleculares más importantes y la capacidad que tiene esta proteína de reaccionar con bacterias; la tercera parte está dirigida al estudio de las células circulantes, demostrar la capacidad fagocítica y la estimulación de éste fenómeno por la aglutinina sérica.

Los objetivos parciales son:

- ▣ La descripción de metodología cuando la reportada para el estudio de otros organismos similares no sea aplicable.
- ▣ La determinación de la presencia y localización del sistema profenoloxidasa;
- ▣ La detección de la actividad hemaglutinante en la hemolinfa del camarón café (*Penaeus californiensis*);
- ▣ El aislamiento de una aglutinina sérica y la determinación de sus principales propiedades aglutinantes, así como sus características moleculares;
- ▣ La participación de estas proteínas en el sistema de defensa, a través de la aglutinación directa de bacterias.
- ▣ La descripción morfológica de las células circulantes;
- ▣ La demostración de la presencia de células fagocíticas y la posible participación de la aglutinina en el fenómeno de fagocitosis.

MATERIALES Y METODOS.

Reactivos.

Fetuna Tipo IV (7.6% NANA); Mucina submaxilar Tipo I; Mannosa, D-galactosa, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-glucosamina, Sialil-lactosa, Lipopolisacárido de *E. coli*, Marcadores de peso molecular (Sigma Chem. Co.). N-acetil-galactosamina-Agarosa (Pierce).

Soluciones.

Para las pruebas de hemaglutinación y purificación de la aglutinina, se utilizó una solución salina amortiguada con Tris (TBS: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5). Esta solución base fué adicionada con 10 mM CaCl_2 , para las pruebas de hemaglutinación (TBS-Ca). Durante la purificación de la aglutinina sérica, a la solución base se le adicionó 1 mM de CaCl_2 (TBS-Ca 1mM) ó 5 mM de EDTA (TBS-EDTA).

La solución isotónica para camarones (SIC) conteniendo 450 mM de NaCl, 10 mM de KCl, y 10 mM de HEPES, pH=7.3, posee la concentración de Na^+ y K^+ , el pH y la osmolalidad de la hemolinfa del camarón [102]. La solución anticoagulante es SIC-EDTA (SIC adicionada con 10 mM de EDTA. Na_2).

Como solución fijadora se utilizó glutaraldehído al 2.5% en cacodilatos 100 mM, pH=7.8, conteniendo 12% de glucosa, la cual ha sido empleada y recomendada para estudios similares [96, 103, 104], ya que prevé la coagulación y alteraciones morfológicas durante la obtención de la hemolinfa. Como líquido de lavado y para la incubación de células se utilizó el medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma Chem. Co.), adicionado con 23.4 g/l de NaCl y 530 mg/l de KCl para obtener concentraciones y osmolalidad similares a hemolinfa de los camarones.

Animales.

Los camarones café (*P. californiensis*) fueron obsequiados por la División de Biología Marina del Centro de Investigaciones Biológicas, a quienes se agradece su colaboración, y mantenidos en nuestros acuarios. Solamente se incluyeron animales aparentemente sanos, en intermuda, con talla y peso promedio de 10.5 cms y 4.7 g, respectivamente.

Extracción de la Hemolinfa.

La hemolinfa fué obtenida de la base de los pleópodos, en los límites de la región formada por el perion y el pleon, ligeramente anterior al orificio genital siguiendo la técnica reportada por Muñoz-Sevilla [105] y utilizando 2-3 volúmenes de anticoagulante SIC-EDTA.

Obtención del Plasma.

Para la purificación de la aglutinina, la hemolinfa fue centrifugada a 2000 g, 10°C, durante 5 minutos. El plasma fué dializado contra TBS-Ca 1mM, centrifugando a 30,000 g, 10°C, 15 minutos y congelado hasta su utilización.

Obtención de las Células.

La muestra de hemolinfa (100 μl) fué mezclada con 200 μl de SIC-EDTA e inmediatamente depositada en un tubo eppendorf silicizado. La muestra fué centrifugada en una microfuga (Eppendorf) durante 10 segundos. Las células fueron lavadas 2 veces resuspendiendo en SIC y centrifugando 10 segundos. El paquete celular fue resuspendido en amortiguador de cacodilatos (0.1 M, pH=7.5) y sonificado durante 1 minuto, 20 watts, 10°C, antes de ser centrifugado 15 minutos, 15,000 g, 10°C. En otros experimentos, en lugar de la sonicación, la suspensión de células (100 μl) fué in-

cubada con 100 μ l de laminarina para inducir la degranulación.

Medición de osmolalidad, pH, Na y K.

Para la determinación de los valores estándares de la concentración de sodio, potasio, osmolalidad y pH de la hemolinfa, los animales se capturaron en San Carlos, B.C.S., México. La temperatura del agua fué de 21°C y la salinidad de 36 partes por mil (ppm). La hemolinfa se obtuvo con una jeringa estéril sin utilizar anticoagulante, siguiendo la técnica descrita por Muñoz-Sevilla [105]. Cada muestra se colocó en un tubo Eppendorf y se mantuvo a 10°C para su transportación. En el laboratorio, el suero se recuperó después de centrifugar la muestra 10 minutos en una microfuga y remover el coágulo. Únicamente hemolinfa de animales en intermuda fueron incluidos en el estudio.

La osmolalidad (mOsm.Kg⁻¹) del suero fué determinada en un osmómetro Wescor 5120B Vapor Pressure, previamente calibrado con soluciones de referencia de 100, 290 y 1000 mOsm.Kg⁻¹. El pH del suero se determinó utilizando un electrodo de superficie. La concentración (mEq.l⁻¹) de sodio y potasio se determinó por flamometría utilizando un Radiometer, FLM 3 flame photometer.

Análisis Químicos.

La cuantificación de las proteínas totales de la hemolinfa se hizo utilizando el reactivo de Folin y albúmina sérica bovina como referencia, siguiendo el método descrito por Lowry y cols. [106]. La técnica fué modificada para volúmenes pequeños, la cual utiliza: 10 μ l de hemolinfa diluída 1:10, 1 ml de reactivo alcalino y 50 μ l de reactivo de Folin 2N son necesarios.

Eritrocitos.

Las muestras de sangre humana (tipos A, B y 0) y de los animales fueron obtenidas de donadores sanos, por punción venosa o cardíaca, según el caso; colectadas y almacenadas en solución de Alsever estéril. Para su utilización, las células fueron lavadas dos veces con solución salina isotónica (NaCl 0.15 M), dos veces con TBS-Ca y resuspendidas al 2% en TBS-Ca.

Hemaglutinación.

Esto se hizo por microtitulación en placa utilizando diluciones seriadas (1:2) del suero del camarón café en TBS-Ca y agregando un volumen igual de la suspensión de eritrocitos al 2%. Las placas fueron mezcladas e incubadas a temperatura ambiente (26 \pm 3 °C) durante una hora. El control para todas las reacciones fue la sustitución del suero por TBS-Ca. La actividad hemaglutinante es reportada como el Log₂ del inverso del título.

Inhibición de la Hemaglutinación.

La solución de glicoproteínas (1.0 %) ó azúcares (100 mM) disueltas en TBS-Ca fueron diluídas en forma seriada en la misma solución amortiguadora. Para el ensayo, 25 μ l de hemolinfa fueron diluídos en forma seriada en TBS-Ca, se les agregó un volumen igual del inhibidor y se incubó una hora a temperatura ambiente antes de agregarle 50 μ l de eritrocitos al 2%. El título se determinó después de hora de incubación.

Desialización de la fetuína.

La fetuína (10 mg/ml) fué hidrolizada con H₂SO₄ 0.1N en NaCl 0.15M, durante una hora a 80°C, de acuerdo a la técnica de Spiro [107]. La proteína desializada fué dializada exhaustivamente con TBS-Ca y congelada hasta su utilización.

Purificación de la Aglutinina.

Se utilizó una columna de 5 ml de N acetilgalactosamina-agarosa (Pierce), empacada y calibrada con TBS-Ca. 8 ml de plasma del camarón café (*Penaeus californiensis*) fueron aplicados a la columna. La columna se lavó con 15 ml de TBS-Ca 1mM y la aglutinina fue eluída con TBS-EDTA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA.Na₂ 5 mM; pH = 7.5). Se colectaron fracciones de 1 ml, a las que se les determinó su densidad óptica a 280 nm, así como su actividad hemaglutinante contra eritrocitos humanos y de ratón.

Dentro del proceso de purificación se utilizó una columna de 1 x 56 cm, empacada con Sepharose 6B, calibrada con TBS-Ca. 0.5 ml de muestra fueron aplicados, manteniendo un flujo de 0.5 ml/hora y colectando fracciones de 0.5 ml. El volumen muerto (V_0) de la columna fue calculado utilizando azul dextrán. Las fracciones fueron analizadas por su actividad hemaglutinante con eritrocitos de ratón.

Electroforesis.

La electroforesis se hizo en placas de poliacrilamida al 7% de 140x140x1mm. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se hizo incubando la muestra con dodecil sulfato de sodio (SDS) o con SDS y 2-mercaptoetanol siguiendo la técnica de Weber y Osborn [108]. La placas fueron teñidas con plata [109].

Determinación del Peso Molecular.

Para la determinación de peso molecular por filtración en gel, se utilizó una columna (1 x 56 cm) empacada con Sepharose 6B™ (Sigma Chem. Co.), lavada y calibrada con PBSA (Phosphate Buffered Saline + Azida) a 18°C y un flujo de 0.5 ml/h. Los marcadores de peso molecular, fueron aplicados individualmente en volúmenes de 0.1 ml. El V_0 de la columna fue determinado por exclusión del azul dextran. La fracciones de los marcadores fue-

ron detectadas por la reacción de Lowry y las de la aglutinina por actividad hemaglutinante.

Para la determinación del peso molecular por electroforesis, se utilizaron marcadores de Sigma Chem. Co. para cada tipo de electroforesis.

Bacterias.

Se utilizaron bacterias del género *Vibrio*: *V. parahaemolyticus* (ATCC 13456); *V. vulnificus* (ATCC 45671); *V. fisheri* (ATCC 2987). Todas fueron propagadas en medio marino 2216 (Difco) a 28 °C, 120 rpm, durante 18 horas. Para mantener homogeneidad en los cultivos, el inóculo se hizo con una suspensión de bacterias de densidad óptica a 580 nm de 1.0, en un volumen equivalente a 1/10 del volumen del cultivo. Al término del cultivo, las bacterias fueron lavadas 3 veces con agua de mar artificial y su concentración se ajustó a una densidad óptica a 580 nm de 1.

Agglutinación de Bacterias.

Se incubaron 25 μ l de la suspensión de bacterias con un volumen igual de aglutinina en cámara húmeda, a temperatura ambiente de 15 a 120 minutos. La aglutinación se determinó por observación directa y bajo el microscopio.

Sedimentación de Bacterias.

Para los experimentos de sedimentación las bacterias fueron lavadas 3 veces con solución salina 0.45M (0.45 M de NaCl + 10 mM de HEPES pH = 7.3) y tratadas con glutaraldehído a una concentración final de 2.5%. Después de mantenerlas en agitación durante 3 horas, la reacción fue suspendida por lavados con solución salina 0.45M. El aldehído residual fue neutralizado incubando con glicina toda la noche, en agitación. No se observaron bacterias viables después de éste tratamiento. Antes de su utilización las bacterias fueron perfecta-

mente lavadas y ajustadas a una densidad óptica de 1, a 580 nm, utilizando celdas de 1 ml.

Para el experimento, se colocaron 50 μ l de la aglutinina purificada en una celda de 1 ml, se les añadió 100 μ l de la suspensión bacteriana y 850 μ l de la solución salina. La celda con la mezcla fue incubada a 28 °C y, sin agitar, fue leída a diferentes tiempos a 580 nm. Cuando se utilizaron inhibidores, 50 μ l de ellos se agregaron 15 minutos antes de agregar las bacterias y la solución salina. Debido a las diferencias en las lecturas de las cubetas, los resultados son expresados como la diferencia en la densidad óptica respecto al tiempo cero, para cada cubeta.

Determinación de la Fenoloxidasa.

La actividad de fenoloxidasa fue determinada por la formación del dopacromo del L-dihidroxifenil alanina (L-DOPA), de acuerdo a la técnica descrita por Leonard y cols. [82]. La muestra (50 μ l) fue incubada con un volumen igual de laminarina (1 mg/ml) durante 15 minutos antes de agregar 100 μ l de L-DOPA (3 mg/ml). Se incubó durante 10-20 minutos, a 25 °C, y se determina la absorbancia a 490 nm. La actividad enzimática es expresada como el cambio en la absorbancia por minuto por mg de proteína.

Preparaciones.

Las preparaciones para microscopía de contraste de fase se hicieron obteniendo directa-

mente la hemolinfa en la solución fijadora de cacodilatos, lo cual evita la coagulación de la muestra y alteración de las células [96]. La muestra fue transferida a un tubo e incubada 15 minutos, antes de su observación en fresco.

Para tinción por hematoxilina-eosina, la muestra fue obtenida utilizando solución anti-coagulante SIC-EDTA y 50 a 150 μ l de esta mezcla se colocan en un portaobjetos. La preparación se incubó 10 a 30 minutos, en cámara húmeda, para permitir la adherencia de las células. La preparación es lavada dos veces con SIC, incubada con solución fijadora durante 10 minutos, lavada y teñida.

Fagocitosis.

La capacidad fagocítica de las células fue determinada de la siguiente forma. Se permitió la adherencia de las células al vidrio, colocando 100 μ l de hemolinfa (diluida en anticoagulante) en un cubreobjeto e incubados en cámara húmeda durante 15 minutos. Las células fueron lavadas dos veces con el medio de cultivo RPMI-1640 modificado y finalmente se adicionaron 100 μ l del mismo medio de cultivo. Se añadieron 50 μ l de una suspensión al 10% de eritrocitos de ratón glutaraldehidados y se mantuvo la incubación en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C, 5% CO₂. Las células fueron lavadas 3 veces con el medio de cultivo, para eliminar el exceso de eritrocitos, y entonces 200 μ l de fijador fueron colocados sobre las células. La tinción se hizo con Giemsa, montadas con bálsamo de Canadá y observada en el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Solución Salina Isotónica para Camarones.

Uno de los primeros requisitos fué la disponibilidad de una solución isotónica para la extracción de la hemolinfa y manipulación de las células *in vitro*. Una solución para este fin ha sido reportada [110] y utilizada para el aislamiento de hemocitos de crustáceos marinos [96, 104, 111] y, modificando la tonicidad para células de insectos [103]. Sin embargo, cuando la hemolinfa de los camarones se obtuvo utilizando esta solución, parte de las proteínas séricas se precipitaron, por lo que su uso fue descartado. De éste modo, buscar y proponer una solución que nos permitiera obtener la hemolinfa de los camarones sin alterar sus propiedades bioquímicas y celulares fué una de los primeros problemas técnicos a resolver.

Para el diseño de la solución isotónica e isosmótica fue menester medir la concentración de sodio y potasio, así como la osmolalidad y el pH de la hemolinfa del camarón café. Los valores promedio son presentados en la tabla 1, donde se puede apreciar la similitud con los valores reportados para camarón azul [112], e incluidos para su comparación. A partir de éstos valores, se diseñó una solución isotónica para el camarón (SIC) la cual contiene: NaCl 0.45 M; KCl 10 mM; Hepes 10 mM; pH = 7.3; Osmolalidad = 850 mOsm/kg. Es posible la adición de CaCl₂ ó EDTA.Na₂ (1 a 10 mM) sin que la solución pierda su isotonicidad. Esto fué confirmado al utilizar la solución base adicionada con 10 mM de EDTA.Na₂ (SIC-EDTA)

	<i>P. stylirostris</i>	<i>P. californiensis</i>
pH	7.31 ± 0.21	7.28 ± 0.17
Sodio (meq/l)	454.16 ± 41.39	456.46 ± 33.38
Potasio (meq/l)	9.85 ± 1.82	10.09 ± 1.26
Osmolalidad (mOsm/Kg)	849.19 ± 52.88	848.74 ± 39.44

Tabla 1. Valores determinados en la hemolinfa de *Penaeus stylirostris* [112] y *P. californiensis*. Se reportan los valores promedio ± desviación estándar.

cómo anticoagulante para los siguientes experimentos. La hemolinfa es fácilmente obtenida (10-100 µl por animal) sin que se observe coagulación o daño celular.

Obtención y Manejo de las Muestras.

La hemolinfa de los camarones (*Penaeus californiensis*) empleados durante este trabajo fue obtenida, siguiendo la técnica descrita por Sevilla Muñoz [105], utilizando de 2 a 4 volúmenes de la solución anticoagulante SIC-EDTA.

Debido a que en otros invertebrados se han descrito aglutininas presentes en las células circulantes [41, 46, 113], ésta técnica permitió separar los componentes celulares de la hemolinfa, evitando así la posible contaminación. La estabilidad de las células puede ser verificada por observación directa del frotis o por evaluación de alguna enzima intracelular (fenoloxidasasa, por ejemplo). Aunque para la hemolinfa utilizada para la purificación de la aglutinina sérica solamente se evaluó la integridad celular por frotis, otros experimentos permiten asegurar que no existe lisis, determinada por liberación de fenoloxidasasa.

Detección y Localización del Sistema profenoloxidasasa.

El sistema de la profenoloxidasasa es un complejo sistema multienzimático, cuyos efectores y reguladores se encuentran perfectamente controlados para dar una protección al animal. La compartimentalización y activación son ejemplos de sistemas complejos en organismos considerados como simples. Además de generar melanina y sus quinonas aromáticas intermediarias con actividad fungistática y bactericida [114-116], el sistema proPO participa en la eliminación de material extraño a través de algunas reacciones celulares de defensa [29, 68,

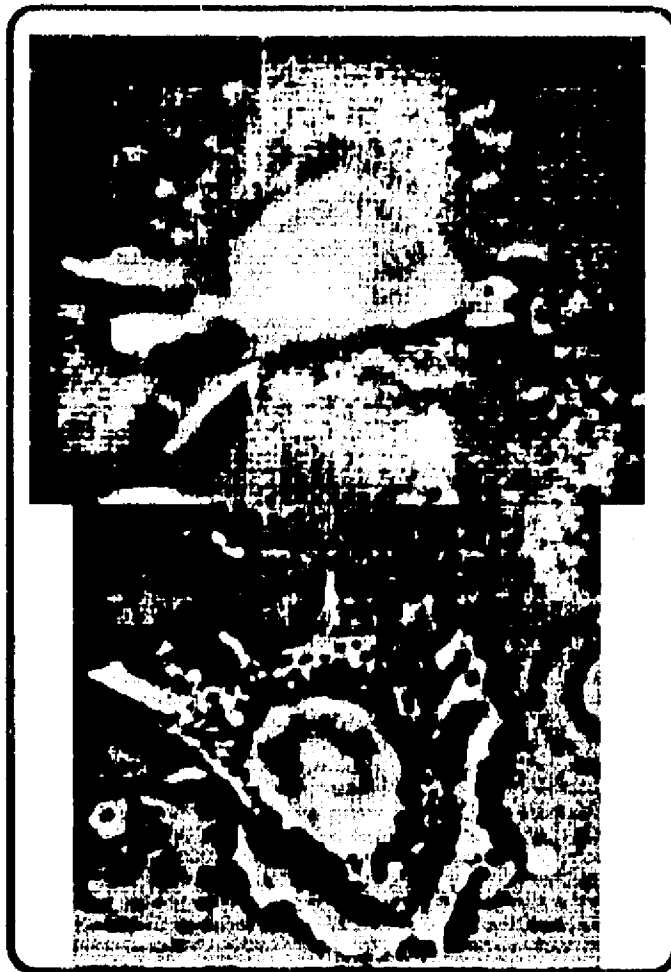


FIGURA 1. La integridad de los hemocitos del camarón café obtenidos de la hemolinfa, utilizando SIC-EDTA como anticoagulante. En la parte superior, se aprecia una célula hialina, caracterizada por la ausencia de gránulos, los cuales son abundantes en las células granulares (foto inferior).

76-80), por lo que se considera parte importante del sistema de defensa en estos organismos [29, 75]. Aunque no tiene actividad hidrolítica directa sobre el agente invasor, el sistema proPO se ha comparado con el sistema del complemento de los vertebrados, por sus reacciones "en cascada"; porque pueden ser activados por proteasas de serina [81-85]; y porque durante su activación se generan osoninas y otros mediadores de la respuesta celular.

Uno de los problemas técnicos importantes en el estudio de la fenoloxidasa es la integridad celular. Debido a que los hemocitos de los invertebrados son altamente reactivos, es necesario encontrar las condiciones adecuadas para

la extracción de la hemolinfa y manipulación de las células. Para la extracción de la hemolinfa y colección de las células del camarón se utilizó SIC-EDTA como solución anticoagulante, sin que se observara daño en las células (Figura 1). Empleando de 2 a 4 volúmenes de SIC-EDTA se pueden obtener muestras de hasta 100 μ l de hemolinfa de camarones con talla de 7 cm en adelante, sin que el animal muera. Las células y el plasma pueden ser perfectamente separados por centrifugación (microfuga Eppendorf, 10 seg) sin que alteraciones morfológicas se detecten en observaciones directas de las preparaciones bajo el microscopio de luz (figura 1).

Para determinar la localización del sistema proPO, las células y el plasma fueron separados por centrifugación (microfuga Eppendorf, 10 seg). Las células fueron lavadas dos veces con SIC y los sobrenadantes colectados. Como se puede apreciar en la tabla 2, la conversión de L-DOPA, sustrato de la fenoloxidasa, fue negativa para el plasma y los sobrenadantes del lavado de células, indicando que esta enzima no se encuentra libre en el plasma y que los lavados no afectan la integridad celular.

Cuando las células fueron sonicadas y el lisado centrifugado, fue posible detectar la actividad de la fenoloxidasa. Sin embargo, la mayor parte (92 %) de la actividad fenoloxidasa pudo ser detectada en el sobrenadante del sonicado y en resto en el sedimento (tabla 2). En consecuencia, estas observaciones indican

FRACCION	ACTIVIDAD*
PLASMA	0.00
Líquido de Lavado	0.00
Lisado de hemocitos	
Sobrenadante	0.41 \pm 0.03
Sedimento	0.02 \pm 0.01
Células + Laminarina	0.85 \pm 0.05

* Diferencia de A490/min . mg de proteína.

Tabla 2. Localización del sistema de la fenoloxidasa en la hemolinfa del camarón café (*P. californiensis*).

que en el camarón café (*P. californiensis*) toda la actividad del sistema proPO se encuentra localizado en el interior de los hemocitos, y que ésta actividad no se encuentra asociada a la membrana, ya que es detectada principalmente en la fase soluble del lisado. Lo anterior es compatible con los resultados reportados para otros crustáceos [77, 110, 117]. Por otra parte, estos resultados demuestran la utilidad de la solución SIC-EDTA para la obtención de hemolinfa, manipulación de hemocitos y estudio del sistema proPO del camarón, ya que no se observan daño celular y/o modificación de su contenido de fenoloxidasas.

Al igual que en el presente trabajo, en otros estudios sobre la detección de la fenoloxidasas se ha utilizado el lisado de los hemocitos obtenidos por sonicación, aun cuando se conocen agentes degranulantes como el ionóforo de Ca^{2+} A23187 [118, 119]. Para el caso del camarón café la degranulación de los hemocitos, con la subsecuente liberación y activación del sistema profenoloxidasas, también es posible llevarla a cabo por adición de laminarina (tabla 2). Por ejemplo, cuando las células son obtenidas y lavadas con SIC, en el sobrenadante no es posible detectar actividad proPO; sin embargo, cuando se adicionaron 50 μg de laminarina a la suspensión, la actividad proPO fue rápidamente detectada (10 minutos).

Se ha reportado que durante la activación del sistema proPO, proveniente de un lisado de hemocitos, algunas proteínas "pegajosas" son generadas [119, 120]. Las actividades biológicas atribuidas a estas proteínas incluyen: lisis de células semigranulares y degranulación de células granulares *in vitro* [77, 110, 120], estimulación de la fagocitosis *in vitro* [77, 121], y el incremento de la encapsulación *in vivo* de esporas de hongos inoculadas en el langostino [68]. Johansson y Söderhäll [119] han identificado a una proteína de 76 Kda que promueve la adhesión celular presente en los hemocitos y que se manifiesta, en su forma activa, durante la activación del sistema proPO.

ORIGINAL	100
Después del	
Primer Lavado	98
Segundo Lavado	96
Tercer Lavado	95
Tratamiento con	
ac. acético 10 mM	65
fosfatos 10 mM pH = 7.0	100
NaOH 10 mM	0

Tabla 3. Determinación de la actividad de fenoloxidasas en tubo. Los resultados son expresados en % de la actividad original (0.87 unidades).

Durante la activación y estudio del sistema profenoloxidasas del camarón café, se observó la presencia de proteínas "pegajosas", aunque no se determinó su naturaleza y otras propiedades. Las células fueron obtenidas y lavadas 2 veces y en el mismo tubo, se indujo la degranulación con laminarina, incubando durante 10 minutos. Después de determinar la actividad de proPO en el sobrenadante, el tubo fue lavado dos veces con SIC antes de probar nuevamente la presencia de fenoloxidasas. La reacción fue positiva y el característico color café oscuro de los fenoles oxidados se localizó principalmente en la superficie del tubo. Este fenómeno se repitió después de dos lavados, lo que indica que la fenoloxidasas se adhiere al vidrio (tabla 3) y que ésta unión es lo suficientemente fuerte para resistir los lavados con soluciones neutras. El lavado con ácido acético 10 mM disminuyó la actividad adherida al vidrio, pero no fue capaz de eliminarla totalmente; esto sólo fue posible lavando el tubo con NaOH 10 mM (tabla 3).

Detección de la Actividad Hemaglutinante.

La hemolinfa del camarón café (*Penaeus californiensis*) tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos de varias especies de mamíferos, aunque con diferentes títulos (tabla 4). La actividad hemaglutinante relativa de la hemolinfa del camarón café es 16 veces mayor para las células rojas de ratón que para las humanas. Por otra parte, no se detectó actividad hema-

Especie	Título	A.H.R.
Humano "A"	1:16	1.00
Humano "B"	1:16	1.00
Humano "O"	1:16	1.00
Caballo	0	0
Carnero	1:2	0.25
Conejo	1:8	0.50
Pato	1:2	0.25
Rata	1:2	0.25
Ratón	1:256	16.00
Vaca	1:2	0.25

Tabla 4. Actividad Hemaglutinante Relativa (A.H.R.) de la hemolinfa del camarón café (*Penaeus californiensis*) hacia eritrocitos de diferentes especies.

glutinante cuando se utilizaron eritrocitos de caballo. Para las otras especies probadas, la actividad hemaglutinante fue relativamente menor que para las células rojas humanas.

Para poder proponer un método de purificación es necesario determinar cuales son los posibles azúcares que la aglutinina reconoce. Por ello, se intentó inhibir la reacción de hemaglutinación con aquellos azúcares más frecuentes en las superficies celulares y con glicoproteínas que poseen residuos sacáridos conocidos. Los resultados son presentados en la tabla 5, donde es posible observar que los monosacáridos GalNAc y GlcNAc, así como la glicoproteína fetuina tienen efecto inhibidor. Este resultado, encontrado para eritrocitos humanos y de ratón, indica que estos compuestos son reconocidos por la aglutinina del camarón café.

Purificación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la inhibición de la hemaglutinación se puede proponer una metodología para la purificación de la molécula responsable de esta actividad presente en la hemolinfa del camarón café. Aunque el aislamiento de una aglutinina es posible utilizando eritrocitos tratados con glutaraldehído [143], el procedimiento no garantiza que la absorción de proteínas esté mediada

INHIBIDOR	Humano	Ratón
Fetuina	0.1	0.1
Mucina submaxilar	n.d.	0.1
N-Ac-Galactosamina	50	50
N-Ac-Glucosamina	50	50
N-Ac-Neuramínico	100	100
Manosa	100	100
Galactosa	100	100
Glucosa	100	100
Glucosamina	100	100
Rafinosa	100	100
Sacarosa	100	n.d.
Xilosa	100	100

Tabla 5. Concentración mínima requerida de glicoproteínas (% p/v) o monosacáridos (mM) para inhibir 4 unidades hemaglutinantes de la hemolinfa del camarón café (*P. californiensis*), utilizando eritrocitos humanos y de ratón al 2%. Diferencias entre los grupos sanguíneos A, B, O no fueron detectadas.

por un fenómeno de interacción proteína-carbohidrato, ya que otras proteínas presentes en la muestra podrían adherirse inespecíficamente a la superficie de la célula roja.

Los primeros intentos de purificación se hicieron por cromatografía de afinidad utilizando una columna de 5 ml de Sepharose-fetuina; sin embargo, la capacidad de la columna fue muy baja, pese a que la fetuina es un buen inhibidor de la hemaglutinación. Por su parte, la absorción con eritrocitos tratados con glutaraldehído no dan la certeza de estar aislando proteína con especificidad por residuos sacáridos. Debido a que la GalNAc es otro de los inhibidores, se intentó la utilización de este azúcar immobilizado en agarosa para la purificación por cromatografía de afinidad.

Utilizando eritrocitos de ratón, rutinariamente se encontraba que no toda la actividad se absorbía en la columna de agarosa-GalNAc, independientemente de la cantidad aplicada. Esto permitió proponer la hipótesis de que, posiblemente, la hemolinfa del camarón café

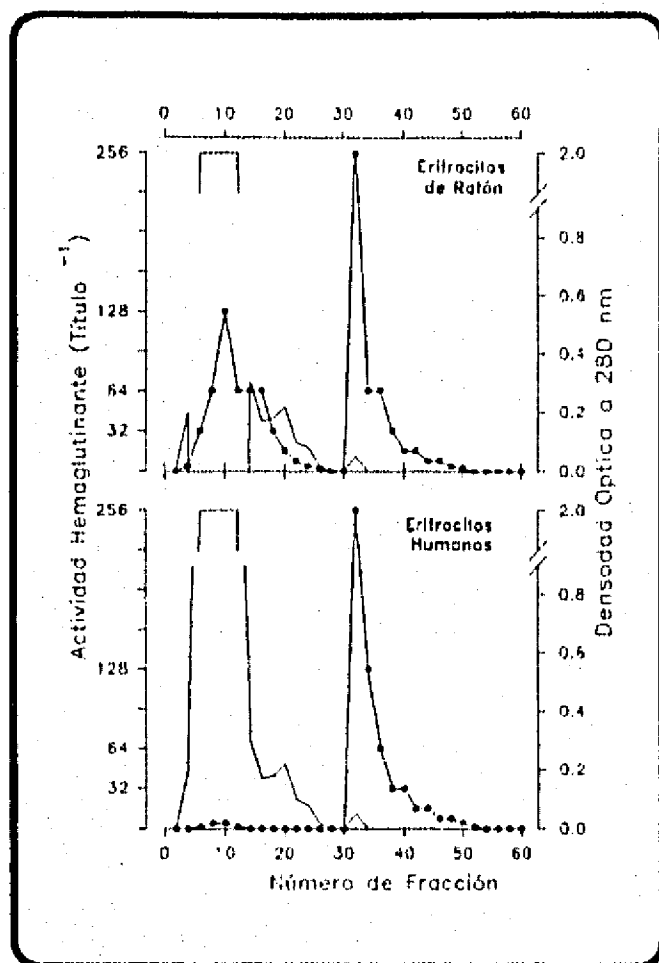


Figura 2. AISLAMIENTO DE LA AGLUTININA DEL CAMARÓN CAFE POR CROMA-TOGRAFIA DE AFINIDAD. Se utilizó una columna de 5 ml de N-acetil-galactosamina-Agarosa equilibrada con TBS-Ca. 8 ml de plasma fueron aplicados a la columna y se lavó con TBS-Ca hasta que la densidad óptica fue cero. La elusión se hizo con TBS-EDTA. Fracciones de 1 ml fueron colectadas, se les determinó su densidad óptica a 280 nm y la actividad aglutinante fué detectada con eritrocitos humanos y de ratón.

tuviera mas de una entidad aglutinante. Para resolver esto, 8 ml de plasma diluído 1:3 (por el anticoagulante) y perfectamente dializados contra TBS-Ca 1mM, se aplicaron a la columna de afinidad. Fracciones de 1 ml fueron colectadas, a las cuales se les determinó su densidad óptica a 280 nm y su actividad hemaglutinante contra eritrocitos de humanos y de ratón. En la figura 2 se presenta el perfil cromatográfico, donde es posible observar la presencia de dos entidades aglutinantes diferentes. El primer pico (Fracción A), no es retenido en la columna, contiene la mayor parte de las proteínas plasmáticas y solamente reacciona con eritrocitos de ratón. Por su parte, el segundo pico (Fracción B), el cual es eluído de la columna con TBS-EDTA, posee actividad aglutinante contra eritrocitos humanos y de ratón, con títulos similares. La Fracción B muestra una gran actividad específica y un importante incremento en el grado de purificación (Tabla 6).

Los tubos de la fracción B, con actividad anti-humano se juntaron, se dializaron y se concentraron por liofilización, para su análisis por electroforesis. El resultado fue una mezcla de dos bandas de proteína, con pesos moleculares aproximados de 200 Kda y 100 Kda. Estas fracciones protéicas fueron fácilmente separadas por cromatografía de filtración utilizando una columna de 1 x 56 cm empacada con Sepharose 6B™, y calibrada con TBS-Ca. Las fracciones fueron analizadas por su actividad hemaglutinante contra eritrocitos humanos y de ratón, pudiendose determinar que la fracción activa corresponde a la banda de mayor peso molecular (cercano a 200 Kda). El factor de purificación se incremento en un 50%

Fracción	Proteína mg/ml	Vol. (ml)	proteína Total(mg)	Eritrocitos de Ratón			Eritrocitos humanos		
				Título	UHA	F.P.	Título	UHA	F.P.
Hemolinfa	42.75	8.0	342.00	1:2048	20.87	1.0	1:128	333.99	1.0
H. dializada	30.06	8.0	240.50	1:2048	14.67	1.4	1:128	234.80	1.4
Fracción A.	18.33	13.5	247.50	1:512	35.80	0.6	1:4	4582.50	0.1
Fracción B.	0.06	15.0	0.85	1:128	0.44	46.9	1:64	0.89	375.3
Sepharose.	0.02	3.0	0.60	1:64	0.32	65.2	1:32	0.62	534.4

Tabla 6. Tabla de purificación de la aglutinina sérica del camarón café (*Penaeus calliforniensis*). FP = factor de purificación; UHA = unidad hemaglutinante.

aproximadamente (tabla 6), y la proteína fue homogénea, manifestándose como una sola banda por electroforesis.

De acuerdo a los datos sobre el procedimiento de purificación utilizando cromatografía de afinidad y filtración en gel, se puede observar que la metodología empleada es adecuada. Los factores de purificación para la aglutinina purificada, varían dependiendo del tipo de eritrocitos utilizados para su detección. Mientras que la actividad contra eritrocitos de ratón se puede detectar también en la fracción A, prácticamente toda la actividad contra eritrocitos humanos es recuperada en la fracción B. Por ello, los diferentes valores en el factor de purificación. Además, estos resultados permiten asegurar que, en la hemolinfa del camarón café (*P. californiensis*) se encuentran cuando menos dos actividades hemaglutinantes. La primera es una fracción no retenida en la columna de afinidad, que mantiene actividad aglutinante contra eritrocitos de ratón y fue excluida de los estudios posteriores. El trabajo se centró en la segunda fracción, que no diferencia entre los grupos sanguíneos humanos (sistema ABO), y los títulos de aglutina-

ción son similares para eritrocitos humanos y de ratón. Este resultado es diferente al obtenido cuando se trabajó con la hemolinfa completa, donde la actividad hemaglutinante para células rojas de ratón es 16 veces mayor que para eritrocitos humanos. La diferencia es fácilmente explicable si se considera que la hemolinfa contiene, además de la aglutinina purificada, otra fracción con actividad hemaglutinante dirigida únicamente contra eritrocitos de ratón.

Cuando la fracción A se concentró y se aplicó a una columna de Sepharose 6B™ (1 x 56 cm, calibrada con TBS-Ca), se observó que la actividad hemaglutinante de la fracción A tiene un peso molecular similar a la aglutinina purificada (fracción B). De este modo, las entidades aglutinantes de la hemolinfa del camarón café difieren en su especificidad, más que en su tamaño molecular.

Determinación del Peso Molecular.

El peso molecular de la proteína nativa se determinó por filtración en gel utilizando una columna de Sepharose 6B. De acuerdo a los

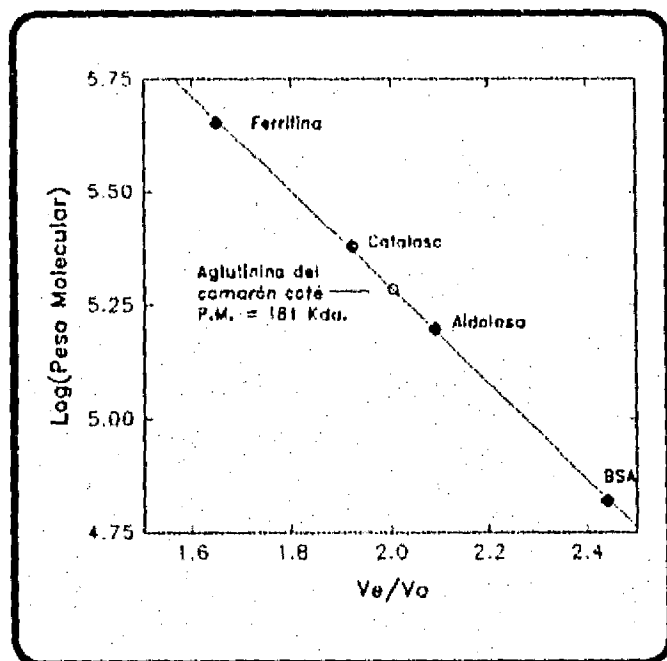


Figura 3. Determinación del peso molecular de la aglutinina del camarón café por filtración en gel, utilizando una columna de Sepharose 6B (1 x 56 cm). Ferritina (450 Kda); Catalasa (240 Kda); Aldolasa (158 Kda); BSA (67 Kda).

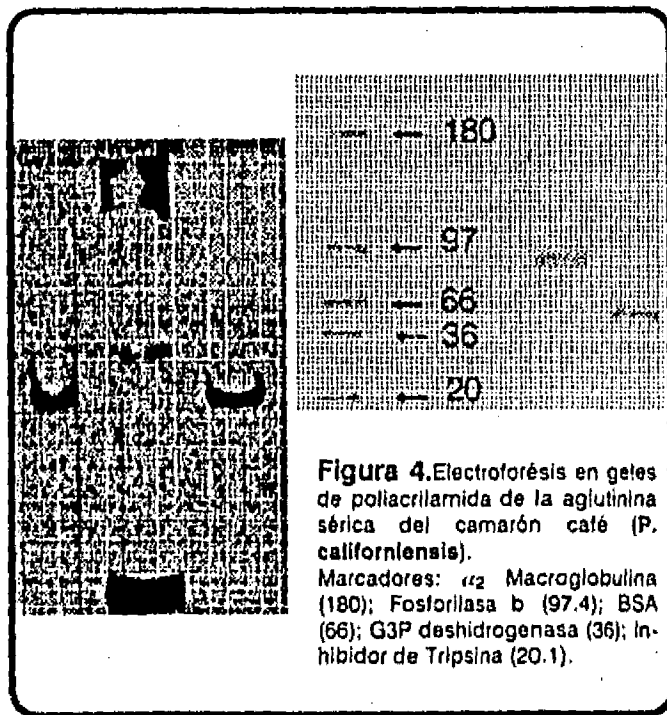


Figura 4. Electroforesis en gels de poliacrilamida de la aglutinina sérica del camarón café (*P. californiensis*). Marcadores: 180 Macroglobulina (180); Fosforilasa b (97.4); BSA (66); G3P deshidrogenasa (36); Inhibidor de Tripsina (20.1).

resultados obtenidos por esta técnica, la aglutinina del camarón café tiene un peso molecular relativo de 180 Kda (Figura 3). Por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa (5 a 20%), se determinó que el peso molecular de la proteína es de 165 Kda, con coeficiente de sedimentación (S_{20}) de 8.6. Por electroforesis en condiciones no desnaturizantes y con la ayuda de marcadores, se determinó que el peso molecular de la aglutinina purificada en su forma nativa, es de 170 Kda (figura 4).

Cuando la electroforesis se llevó a cabo en presencia de SDS, la proteína se disocia en dos cadenas de 85 Kda cada una. Esto significa que la aglutinina está formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por enlaces no covalentes. Si la electroforesis se hace en condiciones disociantes y reductoras (SDS+2ME) se obtiene una sola banda con un peso molecular aproximado de 41 Kda (figura 4). De acuerdo a estos resultados la molécula completa, con peso molecular de 170 Kda, está formada por

cuatro subunidades, dos de ellas unidas entre sí por puentes disulfuros y el par de dímeros unidos por enlaces no covalentes, como se ilustra en la figura 5.

Inhibición de la Hemaglutinación.

Cuando una aglutinina (lectina) ha sido detectada, el siguiente paso consiste en conocer su especificidad. Posiblemente la técnica más utilizada es la inhibición de la hemaglutinación. Por lo que, con esta técnica se analizó la capacidad inhibidora de algunas glicoproteínas y azúcar, cuyos resultados son presentados en la tabla 7.

Sin embargo, los resultados obtenidos por inhibición de la hemaglutinación deberán analizarse cuidadosamente, ya que se manifiestan aparentes contradicciones. Por un lado, la fetuina es un inhibidor de la aglutinina del camarón café; mientras que la asialofetuina posee

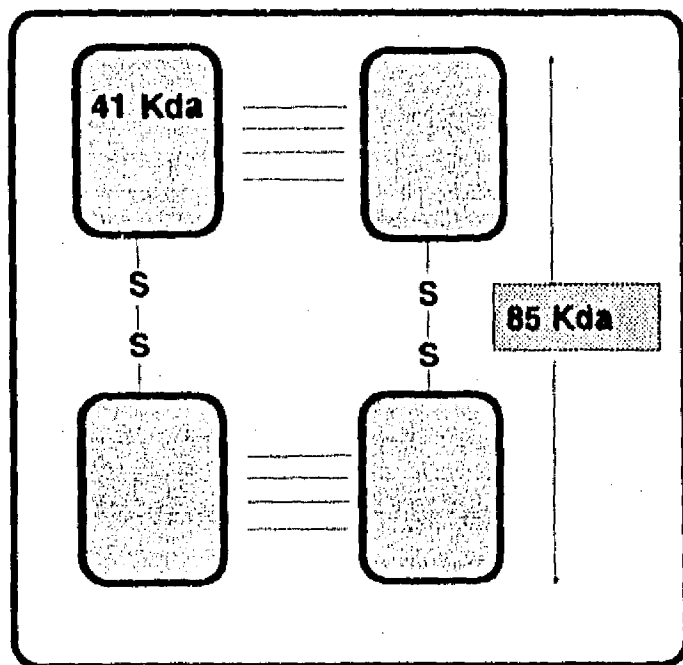


Figura 5. Modelo de la molécula de la aglutinina del camarón café (*P. californiensis*) de acuerdo a los resultados obtenidos por filtración en gel y las electroforésis. Aparentemente la molécula se encuentra constituida por cuatro cadenas polipeptídicas del mismo peso molecular. Dos pares de 85 Kda, unidos por enlaces disulfuros, se encuentran asociados por enlaces no covalentes.

GLICOPROTEINAS (mg/ml)	
Fetuina	0.62
Fetuina desializada	5.00
Mucina Porcina	n.i.
Mucina Submaxilar Bovina	1.25
Orosomucoide	5.00
Transferrina humana	5.00

AZUCARES (mM)	
Fucosa	n.i.
Galactosa	n.i.
Glucosa	n.i.
Mannosa	n.i.
N-Acetil galactosamina	25
N-Acetil glucosamina	50
N-Acetil neuramínico	50

Lipopolisacárido (mg/ml)	0.012
--------------------------	-------

n.i. no inhibición a 10 mg/ml de glicoproteínas ó 100 mM de azúcar.

Tabla 7. Concentración de glicoproteínas y azúcares capaces de inhibir 4 unidades hemaglutinantes de la aglutinina del camarón café (*P. californiensis*).

un efecto inhibitor 10 veces menor, lo que podría llevar a la conclusión de que la aglutinina requiere de NeuNAc en el ligando. Sin embargo, este monosacárido solamente mostró una pequeña capacidad inhibitoria es observada. Además, la capacidad del GalNAc de inhibir parcialmente la reacción y que una columna de afinidad con este ligando permite el aislamiento de la aglutinina, hace pensar que éste azúcar está involucrado en el sitio de reconocimiento de la aglutinina del camarón café. Sin embargo, no se observó mayor actividad para eritrocitos humanos tipo A, donde éste azúcar es el determinante del grupo sanguíneo.

Por todo lo anterior, es posible que la aglutinina del camarón café posea una especificidad compleja y que su determinación requiera algo más que la inhibición por azúcares simples. De la tabla 7, por el contrario, se desprende un resultado interesante que, en gran medida, ayuda a explicar la compleja especificidad y el posible papel biológico de la aglutinina purificada. Queriendo explicar su función se probó el efecto inhibitor del LPS y el resultado fue que éste compuesto es un potente inhibitor de la aglutinina del camarón café. Las concentraciones requeridas para que el efecto se manifieste son pequeñas (12 µg/ml son capaces de inhibir 4 unidades hemaglutinantes), colocándolo a la cabeza en la lista de posibles ligandos. Mas aún, permite sugerir que es a esta molécula donde la aglutinina sérica se une principalmente, cuando una bacteria gram negativa penetra al cuerpo del camarón.

Interacción con Bacterias.

La capacidad que tienen las aglutininas séricas de los invertebrados para reconocer y aglutinar bacterias es conocida y ha sido bien documentada [16-21, 41, 43]. De acuerdo a la hipótesis inicial, de que la(s) aglutinina(s) sérica(s) del camarón participan como moléculas de reconocimiento, se evaluó la capacidad de la aglutinina purificada para reaccionar con bacterias marinas del género *Vibrio*, dentro de las que se conocen especies patógenas para los camarones.

Utilizando una técnica que mide el grado de sedimentación de las bacterias por densidad óptica a 580 nm, se pudo demostrar que la aglutinina del camarón café es capaz de interactuar con bacterias, incrementando su velocidad de sedimentación. Aunque los valores obtenidos son unidades de densidad óptica, los resultados se reportan como el decremento de la densidad óptica inicial, expresado en porcentaje y es denominada porcentaje de sedimentación.

$$\% \text{ de Sedimentación} = 100 - ((DO_t - DO_i) * 100) / DO_i$$

donde: DO_i es la densidad óptica inicial.

DO_t es la densidad óptica a un tiempo dado.

Trabajando con la aglutinina purificada del camarón café, con bacterias del género *Vibrio* (colección ATCC) y con la técnica de disminución de la densidad óptica (a 580 nm) como medida de aglutinación (y subsecuente precipitación) se obtuvieron los resultados que se presentan en las figura 6 y 7. De acuerdo a estos, se puede concluir que la aglutinina purificada de la hemolinfa del camarón café es capaz de interactuar, cuando menos, con tres

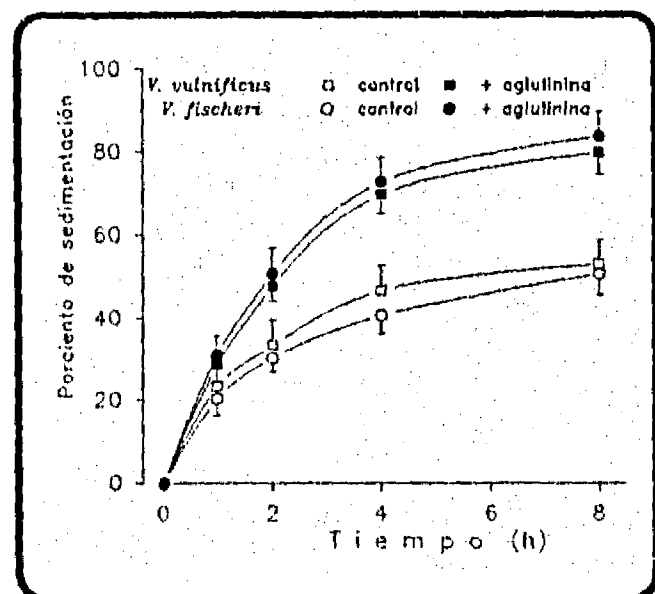


Figura 6. Incremento en la velocidad de sedimentación de las bacterias por reacción con la aglutinina del camarón café.

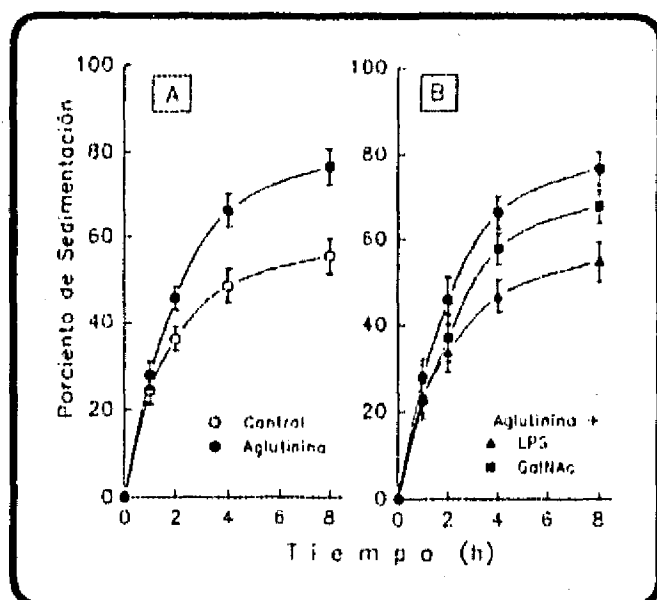


Figura 7. A). Disminución de la densidad óptica a 580 nm, como medida de interacción de *Vibrio parahaemolyticus* y la aglutinina del camarón café. B). Inhibición de la reacción por LPS y GalNAc.

especies diferentes de *Vibrio*. Esta reacción es básicamente igual para las tres cepas probadas, ya que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Aunque se utilizaron bacterias muertas y tratadas con glutaraldehído, resultados similares se obtienen cuando se trabaja con bacterias vivas. La única diferencia es la velocidad de sedimentación, la cual es menor con las bacterias vivas, posiblemente debido a la movilidad de las bacterias. La utilización de bacterias glutaraldehizadas permite obtener resultados más rápidos, ya que el fenómeno es visible a las 2-4 horas de incubación.

Utilizando esta técnica de sedimentación bacteriana se probó el efecto inhibitorio de la GalNAc y del LPS, dos inhibidores de la hemaglutinación, para observar su comportamiento en un sistema diferente. Para el ensayo se trabajó únicamente con *V. parahaemolyticus* el cual puede ser aglutinado y sedimenta más rápido, por la aglutinina del camarón café (figura 7). Sin embargo, si la aglutinina se incubaba primero (15 minutos) con el probable inhibidor, la velocidad de sedimentación de las

bacterias se afecta. Con el LPS el incremento en la sedimentación no se aprecia y la bacteria sedimenta a la misma velocidad que en ausencia de aglutinina (control) indicando un importante efecto inhibitorio. Sin embargo, cuando se utilizó GalNAc como inhibidor, un incremento en la sedimentación es apreciado, aunque en menor grado que sin inhibidor. Lo anterior indica que GalNAc tiene un efecto inhibitorio menor que el LPS, en forma similar a lo observado en las pruebas de hemaglutinación.

Este resultado confirma que GalNAc tienen un efector inhibitorio sobre la aglutinina del camarón café, pero no lo suficiente para bloquear totalmente su reacción, como el caso del LPS. De este modo, la aglutinina sérica aislada del camarón café por cromatografía de afinidad en una columna de GalNAc parece tener una mayor capacidad para unirse al LPS o a superficies de bacterias gram negativas, que al monosacárido.

Se han reportado otras proteínas que pueden unirse al LPS, tanto en vertebrados [122, 123], como en invertebrados [124, 125], pero no han sido definidas como aglutininas. Por otra parte, recientemente se reportó [113] la purificación de una aglutinina con capacidad de unirse al LPS y de aglutinar bacterias, presente en la membrana de los hemocitos de *Halocynthia roretzi*. Sin embargo, no ha sido posible encontrar el reporte de alguna aglutinina sérica con especificidad similar a la del camarón café aislada en este trabajo. De este modo, aunque el camarón no es el único organismo que posee moléculas con capacidad de reaccionar con el LPS, la aglutinina purificada, es la primera aglutinina sérica que se reporta con esta capacidad.

La inhibición por LPS, tanto en la hemaglutinación como en la sedimentación bacteriana, permiten proponer que este compuesto es uno de los ligandos naturales de la aglutinina del camarón café y que posiblemente sea una efectiva señal para activar el sistema de defensa del camarón, en este caso. Otros mecanismos

de defensa de los invertebrados también pueden ser activados por este compuesto, como es el caso del sistema fenoloxidasa [86, 90, 118, 126, 137], la fagocitosis [77], la nodulación [126, 128] y la coagulación [101].

Así, es paradójico que el patógeno lleve consigo la señal que motiva su destrucción; pero es explicable que los organismos capaces de responder a una señal portada por un agente extraño sean los que hayan sobrevivido a lo largo de la evolución. Más aún, la capacidad del sistema inmune de responder al LPS ha sido bastante conservada y células inmunes de vertebrados son activadas por este compuesto induciendo citotoxicidad [129], eritrofagocitosis [130], quimiotaxis [131], producción de anión superóxido [132] y síntesis de interferón [133].

Así, pese a las diferencias entre las características moleculares y/o morfológicas de sus componentes, aparentemente, el sistema inmunológico de todos los animales ha mantenido mecanismos efectivos para el reconocimiento y eliminación de patógenos. Lo anterior permitirá, en breve, proponer un concepto unificador de los sistemas inmunes que abarque, a vertebrados y a invertebrados.

Los Hemocitos.

En los crustáceos, los hemocitos están involucrados en varias funciones, a través de fenómenos biológicos como son: la coagulación, el reconocimiento, la fagocitosis y el encapsulamiento [70, 95]. Aunque las recientes investigaciones han extendido la información sobre el papel fisiológico de estas células en un organismo, generalizar esta información es difícil debido a la falta de un esquema de clasificación para los hemocitos de todos los crustáceos. Si bien, morfológicamente se ha podido definir, en algunos organismos, los tipos de células que se encuentran en la hemolinfa, no ha sido posible correlacionar la morfología con la función. Mas aún, existen problemas, en algunas especies, para clasificar los hemocitos y se han utilizado diferentes nombres o criterios.

En *Sicyonia ingentis* se ha desarrollado una clasificación de hemocitos que relaciona los hallazgos morfológicos, citoquímicos y tres funciones esenciales: coagulación, fagocitosis y encapsulamiento [97-100]. En este organismo sus células hialinas son fácilmente identificadas por microscopía electrónica y por dar positiva la tinción con Negro Sudan, en forma similar al coagulogeno sérico de otros crustáceos [101]. Adicionalmente, las células hialinas no tienen capacidad fagocítica y no contienen fenoloxidasa [98]. En contraste, los granulocitos contienen numerosos gránulos pequeño (0.4 μm) o grandes (0.8 μm), contienen fenoloxidasa, no participan en la coagulación y son capaces de fagocitar y encapsular [100]. Así, es posible la división de dos grupos funcionales y morfológicamente diferenciables.

Por otro lado, el tipo de microscopía requerido parece ser también un punto de discusión. Mientras que algunos autores utilizan únicamente microscopía de contraste de fases [122], otros consideran que esto no es suficiente [104] y prefieren la microscopía electrónica o una combinación de ambas técnicas [96]. Otros autores [104, 111] han incorporado estudios citoquímicos en un esfuerzo para optimizar el esquema de clasificación.

Microscopía de Contraste de Fase.

Aunque la SIC-EDTA es una solución anti-coagulante adecuada para la obtención de células circulantes del camarón, la técnica para microscopía de contraste de fases recomienda la utilización de una solución fijadora para evitar la coagulación y fijar la células lo más rápidamente posible, garantizando un mínimo en los cambios celulares [96, 104, 111, 122].

Cuando las células fueron obtenidas en solución fijadora de cacodilatos, lavadas y observadas por microscopía de contraste de fases, se encontraron 2 poblaciones celulares, morfológicamente diferenciables. De acuerdo al esquema general de clasificación de los hemocitos de crustáceos, estas corresponden a células

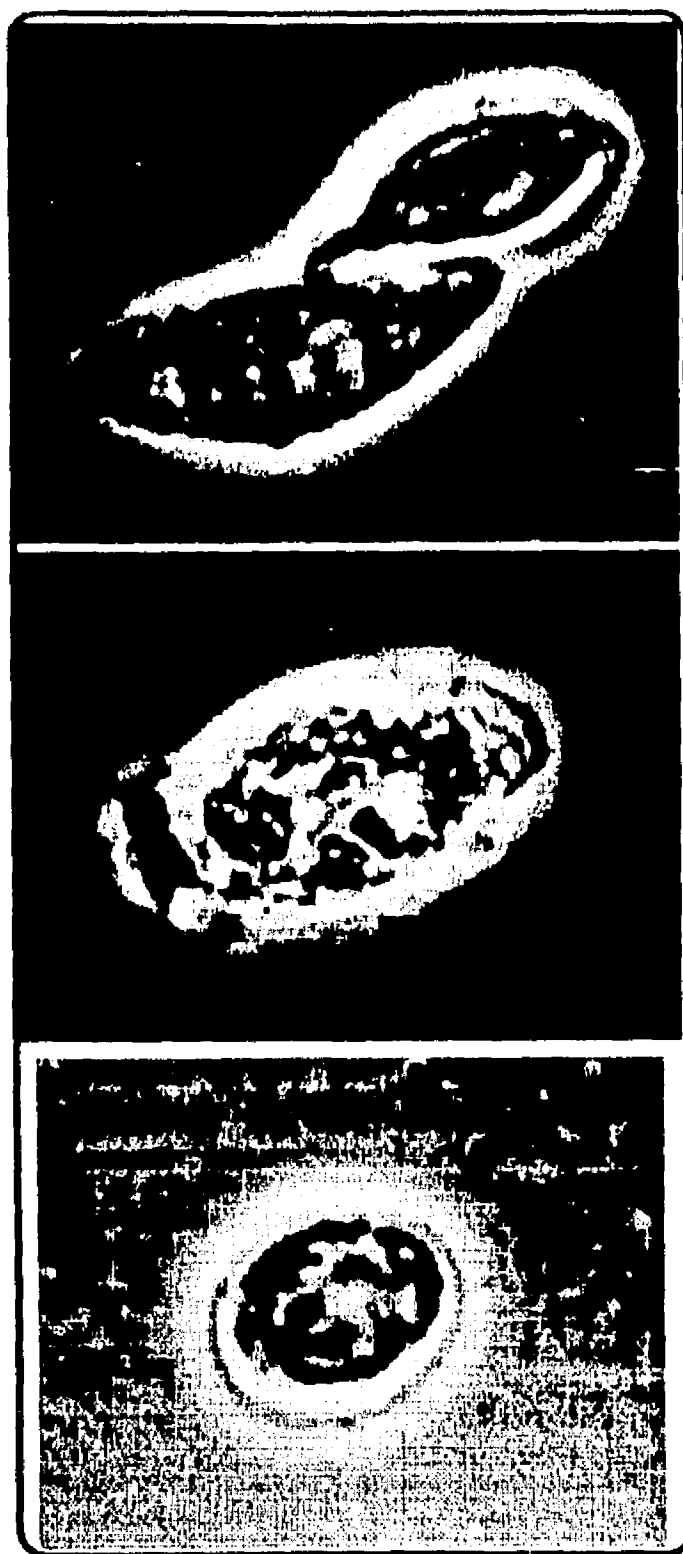


Figura 8. Microscopia de contraste de fases. Células granulares (arriba y enmedio) y célula hialina (abajo) del camarón café (*Penaeus californiensis*). Los células granulares son ovadas, presentan numerosos gránulos refringentes de diferente tamaños. La célula hialina, es circular, no tiene gránulos y su núcleo es grande.

hialinas y granulares. Aunque es posible observar los gránulos, es difícil evaluar el tamaño de éstos (figura 8). Los gránulos son refringentes, lo que impide definir su tamaño y en algunos casos los gránulos pequeños no muestran refringencia. Así, de acuerdo con otros autores [104, 111], la utilidad de ésta técnica es limitada.

Tinción de los Hemocitos.

La rápida coagulación que presenta la hemolinfa es una gran limitante en el estudio de los hemocitos, lo que ha impedido, parcialmente, la utilización de tinciones para la diferenciación de ésta células. Martin y Graves [96] señalan que la tinción de Wright es ambigua y causa distorsión en la forma de las células, por lo que ellos excluyen esta técnica de sus estudios morfológicos. Sin embargo, para observar hemocitos fagocíticos en monocapa ellos utilizan la tinción de MayGrunwald-Giemsa [111].

El problema fundamental radica en la preparación de un frotis en forma directa. Fenómenos de coagulación, degranulación y lisis se ponen de manifiesto y las células modifican sus propiedades rápidamente. Sin embargo, este problema puede ser resuelto aprovechando la capacidad que tienen los hemocitos para adherirse al vidrio (o plástico), así como la eficiencia de las soluciones SIC, SIC-EDTA, y MCC para la manipulación de hemocitos del camarón.

La hemolinfa se obtiene en SIC-EDTA y se incuba en un portaobjetos durante 15 minutos, en cámara húmeda, 5% de CO₂. La preparación se lava dos veces con SIC para eliminar a las células no adheridas. Sin permitir el secado, las células son fijadas con solución de glutaraldehído en cacodilatos durante 10 minutos, lavadas y teñidas por Hematoxilina/Eosina o Giemsa, siguiendo el procedimiento descrito para cada una de estas técnicas. Durante la incubación para permitir la adherencia, no se manifiesta degranulación, demostrable por la ausencia de fenoloxidasas en el sobrenadante.

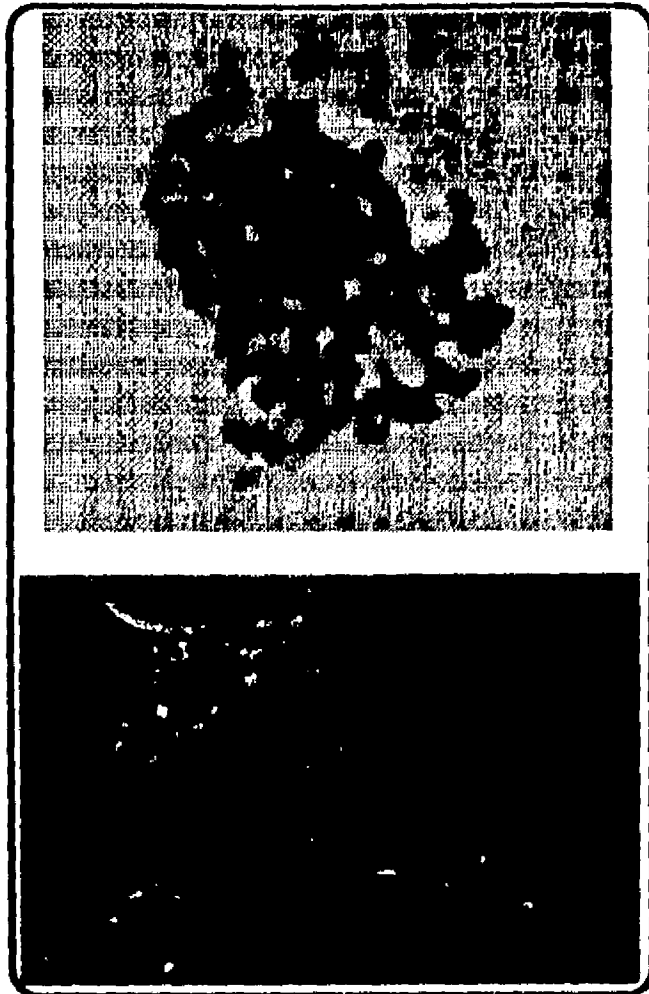


Figura 9. Tinción con Hematoxilina Eosina. Las células fueron obtenidas utilizando SIC-EDTA, adheridas al vidrio y teñidas. Resultados similares se obtienen utilizando Giemsa, para su tinción.

La mayor parte de las células adheridas son granulares (45%) y subgranulares (35%), mientras que la hialinas solamente constituyen un 20%. Las células no adheridas fueron analizadas colectando el sobrenadante de los cultivos, centrifugando y el paquete celular fijado con solución de cacodilatos. De acuerdo a las imágenes de microscopía, el mayor porcentaje son células hialinas (75%) y el resto pertenece a granulares y subgranulares. Así parece ser que las células con gránulos, pequeños y grandes, tienen mayor adherencia al vidrio que las células hialinas, lo cual es similar para otros crustáceos estudiados [111, 134]. Las células granulares adheridas presentan formas alargadas ($25 \times 15 \mu\text{m}$, promedio) y sus gránulos son fácilmente observados. Los gránulos pueden ser de $1 \mu\text{m}$ o de $0.5 \mu\text{m}$, basófilos, en algunos

casos son tan abundantes que impiden ver el núcleo. Las células presentan extensiones citoplasmáticas y el borde es irregular. Las células hialinas, toman la forma circular ($20 \mu\text{m}$ de diámetro), con bordes regulares, sin extensiones citoplasmáticas, no muestran gránulos, aunque pueden observarse algunas inclusiones.

Así la diferenciación entre las células hialinas y las granulares puede hacerse fácilmente. A diferencia de la microscopía de contraste de fases, el procedimiento aquí descrito permite definir el número y tamaño de los gránulos. Algunos autores [revisados en 95] han clasificado las células granulares de los crustáceos en subgranulares o semigranulares y granulares, utilizando como criterio el número, más que el tamaño de los gránulos. De acuerdo a las imágenes obtenidas, los gránulos pueden variar en tamaño; pero una célula contiene solamente de un tipo. Esto es similar a lo descrito *Penaeus japonicus* [104], donde además los autores proponen la utilización de los nombres de células de gránulos pequeños y células de gránulos grandes para describir a las semigranulares y granulares, respectivamente. Esta nomenclatura parece ser más conveniente, ya que el criterio fundamental es el tamaño, más que el número de los gránulos.

En lo referente a las células denominadas hialinas [95] o agranulares [96], Tsing y cols., [104] dicen que esto es aceptable únicamente a nivel de microscopía óptica, ya que bajo el microscopio electrónico no es posible afirmar que tales células no tengan inclusiones citoplasmáticas. Además, éstos autores [104] proponen, y utilizan, el nombre de hemocito no diferenciado para estas células, debido a la elevada relación núcleo:citoplasma, la gran cantidad de eucromatina, el aparato de Golgi poco desarrollado y el gran número de ribosomas, que las hace parecer como células en los primeros pasos de diferenciación.

La diferenciación de los hemocitos es un tema aún en discusión. Algunos autores han propuesto una evolución de células hialina hacia

hemocitos granulares [144, 145] o en un sentido inverso, empezando con hemocitos granulares hacia células hialinas [146]. Por otro lado, Sternsheim y Burton [147] no encuentran evidencia que sugieran que un tipo de célula es una fase del desarrollo de otra.

De este modo, las discrepancias en la nomenclatura parecen fundamentarse en los criterios utilizados y, a falta de datos que expliquen la vía de diferenciación de los hemocitos circulantes, el problema parece persistir. En el presente trabajo se evita la confusión al considerar la existencia de tres poblaciones celulares: las células hialinas, en las cuales no es posible detectar gránulos en preparaciones teñidas, adoptan la forma circular de bordes regulares y no muestran pseudópodos cuando son adheridas. Las otras dos poblaciones son células granulares, forman pseudópodos, tienen bordes irregulares y adoptan la forma alargada. La diferencia entre ellas es el tamaño de los gránulos. De acuerdo con Tsing y cols. [104] son denominadas células de gránulos pequeños (0.5-0.8 μm) y células de gránulos grandes (0.8-1.0 μm).

Fagocitosis.

Una de las actividades más importantes de los hemocitos es la fagocitosis. Este fenómeno se ha demostrado en los invertebrados y se considera como la principal línea de defensa [17, 28, 68-70]. La capacidad fagocítica de las células adherentes del camarón café fue estudiada utilizando eritrocitos de ratón glutaraldehidados como célula blanco. Eritrocitos nativos no pueden ser utilizados debido a que la tonicidad del medio de reacción es elevada (0.45 M de NaCl) y se lisan espontáneamente. De acuerdo a las figuras 10 y 11 aparentemente todos los tipos de células adheridas llevan a cabo fagocitosis, aunque en mayor porcentaje son las granulares (gránulos pequeños y grandes). La presencia de células hialinas fagocíticas ha sido reportada en otras especies [77, 110, 134]; aunque para otras especies reportadas, la fagocitosis está restringida a las células granulares [111].

	% de hemocitos fagocitando	GR por 100 hemocitos
GR	8	25 \pm 4
GR + Aglutinina	16	53 \pm 6
GR opsonizados	18	62 \pm 8

Tabla 8. Fagocitosis de eritrocitos de ratón (GR) en presencia o ausencia de la aglutinina del camarón café (*Penaeus californiensis*).

La fagocitosis en los invertebrados es estimulada por factores séricos que se unen a la partícula extraña y a receptores en la superficie celular [61, 76, 135-139]. Las moléculas involucradas en el reconocimiento incluye a las aglutininas y productos de la activación del sistema proPO [17, 20, 28]. Utilizando el mismo modelo de eritrofagocitosis establecido para el estudio de los hemocitos del camarón se evaluó la capacidad de la aglutinina sérica purificada del camarón café (*P. californiensis*). Como se puede ver en la tabla 8 la actividad fagocítica de los hemocitos de camarón se incrementa por la presencia de la aglutinina. La aglutinina puede ser adicionada directamente al cultivo al momento de adicionar los eritrocitos, o bien, las células rojas son incubadas previamente con la aglutinina, lavadas y adicionadas al cultivo. Con este último tratamiento se permite la formación de una partícula con la aglutinina en la superficie (eritrocitos opsonizados).

Las células fagocíticas y/o los cultivos donde se llevó a cabo la eritrofagocitosis mostraron daño celular que incluye: degranulación, lisis y cambios morfológicos importantes (cariólisis y picnosis). Cuando el sobrenadante de estos cultivos fue incubado con L-DOPA, la actividad de fenoloxidasa pudo ser determinada. En los controles, no se observó daño o cambios celulares, ni el sobrenadante contenía fenoloxidasa. Al revisar los frotis, teñidos, es notoria la desaparición de gránulos de las células. Por lo anterior es posible que algunas de las células "hialinas fagocíticas" sean células degranuladas. Sin embargo, como se muestra en la figura 11, la célula muestra características de célula hialina, y se encuentra rodeada de eritrocitos. Esta imagen fue lograda utilizando microscopía

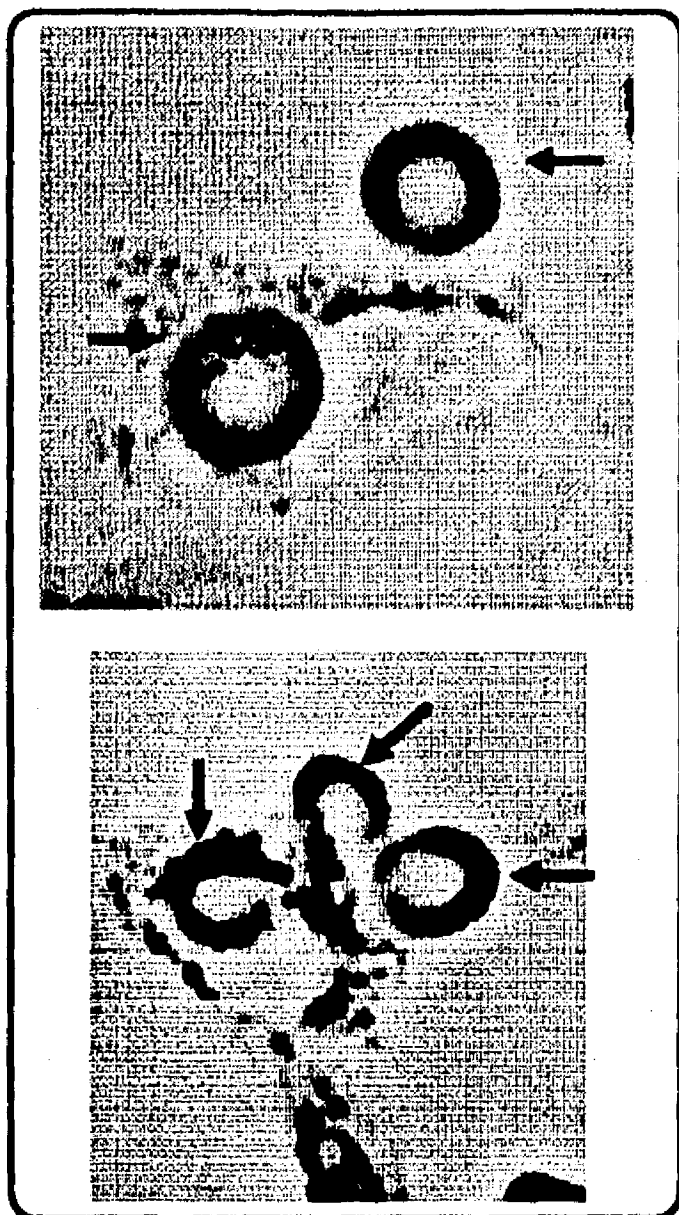


Figura 10. Hemocitos granularea del camarón café fagocitando eritrocitos de ratón. Los gránulos oscuros son visibles en todo el citoplasma. Los eritrocitos son indicados con las flechas.

diferencial de fase. Por otro lado, la degranulación durante la fagocitosis no es un fenómeno general, ya que también se encuentran células con gránulos que tienen actividad fagocítica.

La degranulación ha sido reportada en otros modelos invertebrados y parece ser un fenómeno generalizado que explica la participación de los hemocitos en los mecanismos de defensa. Cuando un hemocito es activado por la



Figura 11. Célula hialina fagocitando. La ausencia de gránulos oscuros es evidente. Sin embargo, se aprecian gránulos blancos (flechas) en el citoplasma.

presencia de una partícula extraña, inicia el proceso de fagocitosis, el cual es acompañado por una exocitosis de sus gránulos [110, 118]. La activación del sistema proPO estimula la actividad fagocítica y las células terminan por presentar cambios morfológicos y bioquímicos que finalmente pueden culminar con la muerte de las células involucradas. Debido a que *in vivo*, este proceso involucraría un daño severo al huésped, se ha propuesto la existencia en el plasma de inhibidores del sistema [134]. Dos inhibidores de proteasas presentes en la hemolinfa del langostino [140, 141] han mostrado tener la capacidad de inhibir la enzima activadora del sistema proPO [142], lo que apoya la existencia de un mecanismo regulador.

En resumen, los hemocitos del camarón café (*P. californiensis*) guardan gran similitud con los reportados para otros crustáceos en cuanto a tamaño, forma y actividades. Tienen la capacidad de fagocitar y durante este proceso es posible la degranulación. La aglutinina sérica del camarón, aislada en este trabajo, tiene la capacidad de incrementar el índice fagocítico aumentando el número de células fagocíticas, más que la relación eritrocito:hemocito.

CONCLUSION.

La importancia del estudio de la inmunidad de los invertebrados radica en puntos diversos, que van desde el interés comercial hasta el puramente científico. En lo comercial, porque un debilitamiento de este sistema de defensa podría ser utilizado para el control de plagas. Por otro lado, el conocimiento de un adecuado funcionamiento, podría ser utilizado para los organismos cultivables, a fin de evitar las grandes pérdidas económicas que causan las enfermedades. El interés científico se basa en la posibilidad de encontrar eventos inmunológicos no detectados en los sistemas superiores, ser modelos de tipos de respuesta inmune en la búsqueda de terapias y definir los mecanismos por los cuales organismos considerados inferiores pueden hacer frente a las agresiones biológicas (y químicas) de su entorno.

Uno de los aspectos mas interesantes es la búsqueda de un concepto unificador de la respuesta inmune. Una forma que permita generalizar la conducta de un sistema, tan diverso en forma y con un solo objetivo: conservar la integridad biológica de los organismos.

En este trabajo, se abordó el estudio de los componentes del sistema de defensa de los camarones. Se seleccionó al camarón café *Penaeus californiensis*, por la importancia económica de este recurso en acuicultura, y su abundancia en el Pacífico norte. Se estudiaron los componentes séricos que, de acuerdo a los antecedentes, podrían estar involucrados en el sistema de defensa del camarón. Los resultados obtenidos nos permiten asegurar que la aglutinina sérica, el sistema fenoloxidasa y los hemocitos fagocíticos participan en el sistema inmune de estos organismos. La participación de la aglutinina no está restringida al reconocimiento de residuos sacáridos en la superficie de células extrañas (eritrocitos o bacterias), sino que permite su aglutinación, precipitación, y facilita su fagocitosis a través de la opsonización.

Hasta la fecha, no se conoce actividad enzimática o lítica de las aglutininas, pero la complejidad del sistema inmune (aún en invertebrados) permite considerar la posibilidad de que, a través de la aglutinina, otro(s) sistema(s) pueda ser activado.

Sobre el mecanismo que estas proteínas utilizan para poder discernir entre lo propio y extraño, es probable que resida en las características de la célula (eritrocito o bacteria) invasora o bien que ésta sea la portadora de una señal que da inicio a las reacciones en el sistema de defensa. Los resultados obtenidos por la inhibición con LPS y la precipitación de bacterias, apoyan esta idea.

Una cantidad importante de actividad aglutinante de la hemolinfa del camarón café no fue retenida por la columna de GalNAc-agarosa. Esta fracción no reconoce a los eritrocitos humanos, pero sí los de ratón. Lo anterior indica que, cuando menos, dos entidades aglutinantes están presentes en la hemolinfa del camarón café. Esto es congruente con lo que parece ser la generalidad de que, en los invertebrados, diferentes entidades moleculares están presentes en la parte soluble de la hemolinfa.

Los resultados obtenidos en la descripción de los hemocitos del camarón café muestran, por una parte, la similitud de estas células con otras especies de crustáceos y son fácilmente incluidas dentro del esquema de clasificación. Del mismo modo, se determinó que estas células tienen capacidad fagocítica y que esta actividad puede ser estimulada por la aglutinina sérica.

Uno de los sistemas mas complejos (e interesantes) que participan en los mecanismos de defensa en los invertebrados es la fenoloxidasa y sus reacciones. La activación de este sistema

por componentes microbianos es posiblemente uno de los factores que disparan los mecanismos de respuesta. La localización intracelular del sistema proPO y su liberación durante la fagocitosis, parece ser una línea terminal del sistema de defensa. Sin embargo, la liberación del sistema proPO y su activación extracelular, incrementa la actividad fagocítica y fortalece el sistema de defensa.

Así, el sistema de defensa (inmune) de los camarones, está conformado por dos componentes: proteínas solubles de reconocimiento y células con capacidad fagocíticas (hemocitos). Los hemocitos, además de su potencial fagocítico, poseen un sistema enzimático capaz de participar directamente en la eliminación de patógenos e indirectamente por la estimulación de otros procesos celulares. De este modo, los factores de defensa se interrelacionan y potencializan para lograr una respuesta mas

eficiente, que concluye con la eliminación de la célula extraña, del organismo.

Los resultados aquí obtenidos permitirán otros estudios tendiente a conocer los niveles séricos de éstos factores y/o su actividad, su modificación por diferentes parámetros fisiológicos y del medio ambiente. Recientemente hemos reportado la modificación de la actividad hemaglutinante del camarón azul (*P. stylirostris*) de acuerdo a su talla (148). Esto significa que estos parámetros pueden ser modificados bajo diferentes condiciones fisiológicas y que deberá de establecerse los valores precisos dependiendo del estado de madurez de los animales. Al lograrlo, la determinación de la actividad hemaglutinante, las cuentas celulares y los niveles de proPO, podría ser utilizada como una técnica de diagnóstico del estado de salud de los camarones, sabiendo de que éstas células proteína y corpúsculos están involucrados en los mecanismo de defensa.

BIBLIOGRAFIA.

1. Neal, R.A. 1973. Alternatives in aquaculture development: consideration of extensive versus intensive methods. *J. Fish. Res. Bol. Can.* 30: 2218-2232.
2. Delves-Broughton, J. & Poupard, C.W. 1976. Disease problems of prawns in recirculation systems in the U.K. *Aquaculture* 7: 201-209.
3. Overstreet, R.M. 1973. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on rared host. *Aquaculture* 2:105-112.
4. Couch, J.A. 1978. Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. *Fish. Bull.* 76: 1-30.
5. Lightner, D. 1985. Disease of cultured penaeid shrimp. In *CRC Handbook of mariculture. Vol. I. Crustacean aquaculture.* CRC Press. pp: 289-319.
6. Magarelli, P.L., Hunter, B., Lightner, D.V. & Calvin, L.B. 1979. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. *Comp. Biochem. Physiol.* 63A: 103-107.
7. Lightner, D.V., Hunter, B., Magarelli, P.L. & Calvin, L.B. 1979. Ascorbic acid; nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. *Proc. World Maricult. Soc.* 10: 513-517.
8. Lightner, D.V. & Lewis, D.H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp, disease of crustaceans. *Mar. Fish. Rev.* 37: 25-38.
9. Fisher, W.S., Nilson, E.H., Steenbergen, J.F. & Lightner, D.V. 1978. Microbial diseases of cultured lobsters: a review. *Aquaculture* 14: 115-124.
10. Chan, E.S. & Lawrence, A.L. 1974. The effect of antibiotics on the respiration of brown shrimps larvae and postlarvae (*Penaeus aztecus* Ives) and the bacterial population associated with the shrimp. *Proc. World Maricult. Soc.* 5: 99-102.
11. Corliss, J.P. 1979. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp *Penaeus setiferus*. *Aquaculture* 16: 1-6.
12. Corliss, J.P., Lightner, D. & Zein-Eldin, Z.P. 1977. Some effects of oral doses of oxytetracycline on growth, survival and disease in *Penaeus aztecus*. *Aquaculture* 11: 355-361.
13. Robaina, G.O. 1983. Effects of salinity and temperature in the survival of shrimp *Penaeus brasiliensis* Latreille (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Rev. Latinoam. Acuicul.* 17: 25-37.
14. Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. *Parasitology* 80: 393-412.
15. Warr, G.W. 1981. Immunity in invertebrates. *J. Inverteb. Pathol.* 38: 311-314.
16. Ratcliffe, N.A. 1985. Invertebrate immunity - A primer for the non-specialist. *Immunol. Lett.* 10: 253-270.
17. Olafsen, J.A. 1988. Role of lectins in invertebrate humoral defense. *Am. Fish. Soc. special publ.* 18: 189-205.
18. Renwanz, L. 1983. Involvement of agglutinins (lectins) in the invertebrate defense reactions: the immunobiological importance of carbohydrate specific binding molecules. *Develop. Comp. Immunol.* 7: 603-608.
19. Rogener, W. & Uhlenbruck, G. 1984. Invertebrate lectins: the biological role of a biological rule. *Develop. Comp. Immunol. Supl.* 3: 159-164.
20. Renwanz, L. 1986. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 56: 81-93.
21. Sminia, T. & van der Knaap, W.P.W. 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. *Develop. Comp. Immunol.* 11: 17-28.
22. Boman, H.G. & Hultmark, D. 1987. Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 103-126.
23. Lackie, A.M. 1988. Immune mechanisms in insects. *Parasitol. Today* 4: 98-105.
24. Yeaton, R.W. 1983. Wound responses in insects. *Amer. Zool.* 23: 195-203.
25. McCumber, L.J. & Clem, L.W. 1983. Recognition of non-self in crustaceans. *Amer. Zool.* 23: 173-183.
26. Dunn, P.E. 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 231-239.
27. Cooper, E.L. 1985. Comparative immunology. *Amer. Zool.* 25: 649-664.
28. Coombe, D.D., Ey, P.L. & Jenkin, C.R. 1984. Self/non-self recognition in invertebrates. *Q. Rev. Biol.* 59: 231-255.
29. Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F., Fitzgerald, S.W. & Rhodes, C.P. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* 97: 183-350.
30. Cooper, E.L. 1990. Immune diversity throughout the animal kingdom. *Bioscience* 40: 720-722.
31. Bayne, C.J. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience* 40: 723-731.
32. Karp, R.D. 1990. Cell-mediated immunity in invertebrates. *Bioscience* 40: 732-737.
33. Dunn, P.E. 1990. Humoral immunity in insects. *Bioscience* 40: 738-744.
34. Lis, H. & Sharon, N. 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.* 42: 541-574.
35. Goldstein, J.J. & Hayes, C.E. 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35: 127-340.
36. Liener, I.E. 1976. Phytohemagglutinins (phytolectins). *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 27: 291-319.
37. Barondes, S.H. 1981. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 207-231.
38. Yeaton, R.W. 1981. Invertebrate lectins: I. Occurrence. *Develop. Comp. Immunol.* 5: 391-402.
39. Yeaton, R.W. 1981. Invertebrate lectins: II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. *Develop. Comp. Immunol.* 5: 535-545.
40. Vasta, G.R. & Marchalonis, J.J. 1984. Distribution, specificity and macromolecular properties of tunicate plasma lectins. *En. Recognition proteins, receptors, and probes: Invertebrates.* Alan R. Liss, Inc. New York. pp: 125-141.
41. Vasta, G.R., Cheng, T.C. & Marchalonis, J.J. 1984. A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* 88: 475-488.
42. Vasta, G.R. & Marchalonis, J.J. 1984. Immunobiological significance of invertebrate lectins. *En. Recognition proteins, receptors, and probes: Invertebrates.* Alan R. Liss, Inc. New York. pp: 177-191.
43. Bayne, C.J. 1980. Molluscan immunology: interaction between the immunogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and the internal defense system of the snail *Helix pomatia*. *Dev. Comp. Immunol.* 4: 215-221.
44. McCumber, L.J., Hofman, E.M. & Clem, L.W. 1979. Recognition of viruses and xenogenic proteins by the blue crab, *Callinectes sapidus*: A humoral receptor for T2 bacteriophage. *J. Invert. Pathol.* 33: 1-9.
45. Pereira, M.E.A., Andrade, A.F.B. & Ribeiro, J.M.C. 1981. Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* 211: 597-600.
46. Vasta, G.R., Sullivan, J.T., Cheng, I.C., Marchalonis, J.J. & Warr, G.W. 1982. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *J. Invert. Pathol.* 40: 367-377.
47. Cheng, T.C. 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Am. Zool.* 23: 129-144.
48. Chadwick, J.M. & Ingram, G.A. 1984. Phylogeny of mediators: Lectins, agglutinins, lysins and complement. *Plenary session summary. Dev. Comp. Immunol. sup.* 3: 183-184.

49. Hall, J.L. & Rowlands, D.T. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry* 13: 821-827.
50. Hall, J.L. & Rowlands, D.T. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. *Biochemistry* 13: 828-832.
51. Vasta, G.R., Warr, G.W. & Marchalonis, J.J. 1983. Serological characterization of humoral lectins from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dev. Comp. Immunol.* 7: 13-20.
52. Bretting, H., Kabat, E.A., Liao, J. & Pereira, M.E.A. 1976. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Aaptos papillata* and a study of their combining sites. *Biochem.* 15: 5029.
53. Vretblad, P., Hjorth, R. & Laos, T. 1979. The isolectins of *Helix pomatia*: separation by isoelectrofocusing and preliminary characterization. *Biochem. Biophys. Acta* 579: 52.
54. Shishikura, F. & Sekiguchi, K. 1983. Agglutinins in the horseshoe crab hemolymph: Purification of a potent agglutinin of horse erythrocytes from the hemolymph of *Tachypleus tridentatus*, the Japanese horseshoe crab. *J. Biochem.* 93: 1539-1546.
55. Vasta, G.R., Warr, G.W. & Marchalonis, J.J. 1982. Tunicate lectins: Distribution and specificity. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 887-900.
56. Vasta, G.R., Hodi, G.H.U., Cohen, E. & Brahm, Z. 1982. A comparative study on the specificity of *Androctonus australis* (Saharan scorpion) and *Limulus polyphemus* (Horseshoe crab) agglutinins. *Dev. Comp. Immunol.* 6: 625-634.
57. Vasta, G.R. & Marchalonis, J.J. 1986. Galactosyl-binding lectins from the tunicate *Didemnum candidum*. Carbohydrate specificity and characterization of the combining site. *J. Biol. Chem.* 261: 9182-9186.
58. Yokoshima, H., Harada, K., Igarashi, K., Abe, Y., Takahashi, K. & Ishii, S. 1986. Galactose-specific lectin in the hemolymph of solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. Molecular, binding and functional properties. *Biochim. Biophys. Acta* 870: 242-247.
59. Yokoshima, H., Sawada, H., Abe, Y., Numakuni, T. & Ishii, S. 1982. Galactose-specific lectin in the hemolymph of solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation and characterization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 451-457.
60. Harada-Azumi, K., Yokosawa, H. & Ishii, S. 1987. N-Acetyl-galactosamine-specific lectin, a novel lectin in the hemolymph of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: Isolation, characterization and comparison with galactose-specific lectin. *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 375-381.
61. McKay, D. & Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachanna bicarminata*). *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 48: 139-150.
62. Vasta, G.R. & Marchalonis, J.J. 1983. Humoral recognition factors in the arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins. *Am. Zool.* 23: 157-171.
63. Cheng, T.C., Guida, V.G. & Gerhart, P.L. 1978. Aminopeptidase and lysozyme activity levels and serum protein concentration in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. *J. Invertebr. Pathol.* 32: 297-302.
64. Wajdani, A., Stein, E.A., Lemmi, C.A. & Cooper, E.L. 1982. Agglutinins and proteins in the earthworm *Lumbricus terrestris*, before and after injection of erythrocytes, carbohydrates, and other materials. *Dev. Comp. Immunol.* 6: 613-624.
65. Babu, P.N.S. & Ray, K. 1988. Haemolymph response to the development of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* in culex quinquefasciatus. *Curr. Sci.* 57: 276-278.
66. Coombe, D.R., Ey, P.L. & Jenkin, C.R. 1982. Haemagglutinin levels in haemolymph from the colonial ascidian *Bolyllodes leachi* following injection with sheep or chicken erythrocytes. *Exp. Biol. Med. Sci.* 60: 359-368.
67. Sharon, N. 1984. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol. Today* 5: 143-147.
68. Söderhäll, K., Vey, A. & Ramsteat, M. 1984. Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Develop. Comp. Immunol.* 8: 23-29.
69. Bayne, C.J. 1984. Immunoparasitology: Invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* sup 3: 197-204.
70. Ratner, S. & Vinson, S.B. 1983. Phagocytosis and encapsulation: Cellular immune response in arthropoda. *Amer. Zool.* 23: 185-194.
71. Whitcomb, R.F., Shapiro, M. & Granados, R.R. 1974. *En: The physiology of Insecta.* (Rockstein, Ed.). Vol 5. pp: 447-536. Academic Press, N. York.
72. Renwrantz, L., Daniels, J. & Hansen, P.D. 1985. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 9: 203-210.
73. Ashida, M. 1971. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.* 144: 749-762.
74. Ashida, M. & Dohke, K. 1980. The prophenoloxidase by the activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10: 37-47.
75. Söderhäll, K.I. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization - a recognition system of arthropods? A review. *Develop. Comp. Immunol.* 6: 601-611.
76. Leonard, C., Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. 1985. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *J. Insect Physiol.* 31: 789-799.
77. Söderhäll, K., Smith, V.J. & Johansson, M.W. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence of cellular co-operation in the defense reactions of arthropods. *Cell Tissue Res.* 245: 43-49.
78. Ratcliffe, N.A. & Gagen, S.J. 1977. Studies on the *In vivo* cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*. *Tissue Cell.* 9: 73-85.
79. Smith, V.J., Söderhäll, K. & Hamilton, M. 1984. α -1,3-glucan induced cellular defense reactions in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A: 635-639.
80. Takle, G.B. & Lackie, A.M. 1986. Chemokinetic behaviour of insect haemocytes *In vitro*. *J. Cell Sci.* 85: 85-94.
81. Ashida, M. 1981. A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 11: 57-65.
82. Leonard, C., Soderhll, K. & Ratcliffe, N.A. 1985. Studies on prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* 15: 803-810.
83. Yoshida, H. & Ashida, M. 1986. Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 16: 539-545.
84. Söderhäll, K.I. 1981. Fungal cell wall α 1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surface of crayfish hemocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* 5: 563-573.
85. Ashida, M. & Soderhll, K. 1984. The prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B: 21-26.
86. Ashida, M., Ishizaki, Y. & Iwahana, H. 1983. Activation of prophenoloxidase by bacterial cell wall or beta-1,3-glucan in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 562-568.
87. Saul, S.J. & Sugumaran, M. 1987. Protease mediated prophenoloxidase activation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 5: 1-11.
88. Ratcliffe, N.A., Leonard, C.M. & Rowley, A.F. 1984. Prophenoloxidase activation: Nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science* 226: 557-559.
89. Unestam, T. & Soderhll, K. 1977. Soluble fragments from fungal cell wall elicit defence reactions in crayfish. *Nature* 267: 45-46.
90. Söderhäll, K. & Häll, L. 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta* 797: 99-104.
91. Soderhll, K., Rogener, W., Soderhll, I., Newton, R.P. & Ratcliffe, N.A. 1987. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of haemocyte prophenoloxidase by a beta-1,3-glucan. *Insect Biochem.* 18: 323-330.

92. Fontaine, C.T. & Lightner, D.V. 1973. Observations on the process of wound repair in penaeid shrimp. *J. Invertebr. Pathol.* 22: 23-33.
93. Fontaine, C.T. & Lightner, D.V. 1974. Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into the abdominal musculature of the white shrimp *Penaeus setiferus*. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 141-148.
94. Wood, P.J., Podlewski, M. & Shenk, T.E. 1971. Cytochemical observations of hemolymph cells during coagulation in crayfish, *Orconectes virilis*. *J. Morphol.* 134: 479-488.
95. Bauchau, A.G. 1981. Crustaceans. In *Invertebrate Blood Cells*. Vol 2. Academic Press, N. York. pp: 386-420.
96. Martin, G.G. & Graves, B.L. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.* 185: 339-348.
97. Martin, G.G., Hose, J.E. & Kim, J.J. 1987. Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn *Sicyoptila ingentis*: light and electron microscopic observations. *J. Morphol.* 192: 193-204.
98. Hose, J.E., Martin, G.G., Nguyen, V.A., Lucas, J. & Rosenstein, T. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol. Bull.* 173: 178-187.
99. Omori, S.A., Martin, G.G. & Hose, J.E. 1989. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn *Sicyoptila ingentis*. *Cell Tissue Res.* 255: 117-123.
100. Hose, J.E. & Martin, G.G. 1989. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyoptila ingentis* Burkenroad 1938. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 335-346.
101. Durliat, M. 1985. Clotting processes in Crustacea Decapoda. *Biol. Rev.* 60: 473-498.
102. Vargas-Albores, F. & Ochoa, J.L. 1992. Variation of pH, osmolality, sodium and potassium concentration in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus styllirostris*) according to size. *Comp. Biochem. Physiol.* (En prensa).
103. Mead, G.P., Ratcliffe, N.A. & Renwantz, L.R. 1986. The separation of insect haemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. *J. Insect Physiol.* 32 (2): 167-177.
104. Tsing, A., Arcier, J.-M. & Brehelin, M. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 64-77.
105. Muñoz-Sevilla, P. 1982. Contribution l'étude de l'hémolymph de *Penaeus karathurus* et *P. japonicus*. Thesis. Faculté des Sciences de Luminy. Université D'Aix-Marseille II. France.
106. Lowry, O.H., Rosebroug, N.L., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
107. Spiro, R. G. 1960. Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum. I. Isolation, chemical composition, and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* 235: 2860-2869.
108. Weber, R. K. & Osborne, B. T. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.
109. Merril, C.R. & Pratt, M.E. 1986. A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins or nucleic acids on membranes and thin layer plates. *Analyt. Biochem.* 156: 96-110.
110. Smith, V.J. & Söderhäll, K. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. *Cell Tissue Res.* 233: 295-303.
111. Hose, J.E., Martin, G.G. & Gerard, A.S. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.* 178: 33-45.
112. Vargas-Albores, F., Guzmán, A. & Ochoa, J.L. 1991. Posibles indicadores de salud de los camarones y su aplicación en acuicultura. *Biotecnología* 1(4): 17-25.
113. Azumi, K., Ozeki, S., Yokosawa, H. & Ishii, S.-I. 1991. A novel lipopolysaccharide-binding hemagglutinin isolated from hemocytes of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: it can agglutinate bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 9-16.
114. Rowley, A.F., Brookman, J.L. & Ratcliffe, N.A. 1990. Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. *J. Invert. Pathol.* 56: 31-38.
115. Söderhäll, K. & Ajaxon, R. 1982. Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular proteases of *Aphanomyces astacti*, a parasite of crayfish. *J. Invertebr. Pathol.* 39: 109-111.
116. St. Leger, R.J., Cooper, R.M. & Charnley, A.K. 1988. The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 459-470.
117. Söderhäll, K.I. & Smith, V.J. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carclnus maenas* and other marine decapods and phenoloxidase distribution. *Develop. Comp. Immunol.* 7: 229-239.
118. Johansson, M.W. & Söderhäll, K. 1985. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *J. Comp. Physiol.* 156B: 175-181.
119. Johansson, M.W. & Söderhäll, K. 1988. Isolation and purification of cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* 106: 1795-1803.
120. Johansson, M.W. & Söderhäll, K. 1989. A cell adhesion factor from crayfish hemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cells. *Insect Biochem.* 19: 183-190.
121. Smith, V.J. & Söderhäll, K. 1983. α -1,3 glucan activation of crustacean hemocytes in vitro and in vivo. *Biol. Bull.* 164: 299-314.
122. Tobias, P.S., Soldau, K., & Ulevitch, R.J. 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164: 777-793.
123. Wright, S.D., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J. & Ramos, R.A. 1989. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 170: 1231-1241.
124. Aketagawa, J., Miyata, T., Ohtsubo, S., Nakamura, T., Morita, T., Hayashima, H., Miyata, T., Iwanaga, S., Takao, T. & Shimonishi, Y. 1986. Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem.* 261: 7357-7365.
125. Jomori, T., Kubo, T. & Natori, S. 1990. Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of American cockroach *Periplaneta americana*. *Eur. J. Biochem.* 190: 201-206.
126. Ratcliffe, N. A., Brookman, J. L. & Rowley, A. F. 1991. Activation of the prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides. *Dev. Comp. Immunol.* 15: 33-39.
127. Brookman, J.L., Ratcliffe, N.A. & Rowley, A.F. 1989. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem.* 19: 47-57.
128. Brookman, J.L., Rowley, A.F. & Ratcliffe, N.A. 1989. Studies on nodule formation in locusts following injection of microbial products. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 315-323.
129. Camron, D.J. & Churchill, W.H. 1980. Cytotoxicity of human macrophage for tumor cells: enhancement by bacterial lipopolysaccharide (LPS). *J. Immunol.* 123: 708-711.
130. Cooper, P.H., Mayer, P. & Baggiolini, M. 1984. Stimulation of phagocytosis in bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopolysaccharide: correlation with biochemical and functional parameters. *J. Immunol.* 133: 913-922.
131. Fittschen, C., Sandhaus, R.A., Worthen, G.S. & Henson, P.M. 1988. Bacterial lipopolysaccharide enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 43: 547-556.
132. Pabst, M.J. & Johnston, R.B. 1980. Increased production of superoxide anion by macrophages exposed in vitro to muramyl dipeptide or lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 151: 101-114.
133. Havelil, E.A. & Spitalny, G.L. 1983. Endotoxin-induced interferon synthesis in macrophage culture. *J. Reticuloendothelial Soc.* 33: 369-374.
134. Johansson, M.W. & Söderhäll, K. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO-system. *Parasitol. Today* 5: 171-176.
135. Anderson, R.S. & Good, R.A. 1976. Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. *J. Invert. Pathol.* 27: 57-61.
136. Sminia, T., van der Knaap, W.P.W. & Edelenbosch, P. 1979. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of freshwater snail (*Lymnaea stagnalis*). *Dev. Comp. Immunol.* 3: 37-44.

137. van der Knaap, W.P.W., Sminia, T., Schutte, R. & Boerrigter-Barendsen, L.H. 1983. Cytophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: In vivo phagocytosis by amoebocytes of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Immunology* 48: 377-383.
138. Tuan, T.-I. & Yoshino, T.P. 1987. Role of divalent cations in plasma opsonin-dependent and -independent erythrophagocytosis by hemocytes of the asian clam, *Corbicula fluminea*. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 310-319.
139. Lalan, A., Lestage, J., Houc, A.M. and Chateaucreynaudduprat, P. 1988. The phagocytic activity of *Lumbricus-terrestris* leukocytes is enhanced by the vertebrate opsonins - IgG and complement C3b fragment. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 269-278.
140. Hergenrohn, H.G., Aspán, A. & Soderhill, K. 1987. Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of prophenol oxidase activation from crayfish plasma. *Biochem. J.* 248: 223-228.
141. Hergenrohn, H.G., Hall, M. & Soderhill, K. 1988. Purification and characterization of an α 2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus tentaculatus*. *Biochem. J.* 255: 801-806.
142. Aspan, A., Hall, M. & Soderhall, K. 1990. The effect of endogenous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. *Insect Biochem.* 20: 485-492.
143. Reitherman, R.W., Rosen, S.D. & Barondes, J.H. 1974. Lectin purification using formalinized erythrocytes as a general affinity adsorbant. *Nature* 248: 599-600.
144. Bodammer, J.E. 1978. Cytological observations on the blood and haematopoietic tissue in the crab *Callinectes sapidus* L. The fine structure of haemocytes from intermolt animals. *Cell Tissue Res.* 187: 79-96.
145. Benjamin, L.R. & James, B.L. 1987. Light and electron microscopy of the hemocytes of *Ligula oceanica* (L.) (Crustacea: Isopoda). *J. Invertebr. Pathol.* 49: 19-25.
146. Vranx, R. & Durliat, M. 1977. Etude des hémocytes circulants de quelques Crustacés Décapodes: Corrélation entre polymorphisme et mode de prélèvement. *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* 285: 1045-1047.
147. Sternsheim, D.J. & Hurton, P.R. 1980. Light microscopic and electron microscopic studies of crayfish hemocytes. *J. Morphol.* 165: 67-84.
148. Vargas-Alhores, F., Guzmán-Munillo, A. & Ochoa, J.-L. (Accepted). Size-dependence haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.*

PRODUCCION CIENTIFICA.

En esta sección se presentan las actividades académicas que se desarrollaron durante los estudios de doctorado y que están relacionadas con el trabajo de tesis: presentaciones en congresos, publicaciones y cursos. Los documentos probatorios, así como la información se localizan en los apéndices correspondiente.

Cursos Impartidos.

1. Inmunidad de Invertebrados. Impartido a estudiantes de maestría de la Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado (CCH-UNAM), Julio 1990.

Congresos, Conferencias.

2. Participación en el "Primer Taller Regional Sobre Análisis de la Pesquería y Perspectivas de Cultivo de Camarón en Baja California Sur". CIB. Noviembre 1988.
3. Actividades Biológicas de la Hemolinfa del Camarón Azul (*Penaeus stylirostris*). VIII Congreso Nacional de Inmunología. San Luis Potosí, S.L.P. octubre 1989.
4. Actividad Hemaglutinante de la Hemolinfa del Camarón Azul (*Penaeus stylirostris*). VIII Congreso Nacional de Inmunología. San Luis Potosí, S.L.P. octubre 1989.
5. Inmunidad en Invertebrados. Seminario presentado en la Fac. de Medicina. UNAM. julio 1990.
6. Hemagglutinins from two penaeids shrimp haemolymph. 12 Interlec. Davis Ca. USA. Sep. 1990.

Publicaciones.

7. Posibles Indicadores de Salud de los Camarones y su Aplicación en Acuicultura. Biotecnología. 1: 17-25 (1991).
8. Variation of pH, Osmolality, Sodium and Potassium Concentrations in the Haemolymph of Sub-adult Blue Shrimp (*Penaeus stylirostris*) According to Size. Comparative Biochemistry and Physiology. (En prensa).
9. Size-dependence Haemagglutinating Activity in the Haemolymph from Sub-adult Blue Shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). Comparative Biochemistry and Physiology. (Aceptado).
10. A Lipopolysaccharide-binding Agglutinin Isolated from the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) Haemolymph. Comparative Biochemistry and Physiology. (Enviado).

APENDICES.

PROYECTO ACADÉMICO ESPECIALIZACIÓN, MAESTRIA
Y DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA**Unidad Académica de los Cielos Profesional y de Posgrado**

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

UNAM - CCH

Of. No. EMD/153/90

M. en C. FRANCISCO VARGAS ALBORES
P r e s e n t e

El Consejo Interno de este Proyecto Académico reunido el pasado 11 de mayo aprobó el Curso INMUNIDAD DE INVERTEBRADOS, por lo que permitimos invitarlo a impartir dicho curso a los estudiantes de la Maestría en Biotecnología, sede Instituto de Investigaciones Biomédicas, durante seis semanas a partir del 2 de julio del presente año.

Agradeciendo de antemano su colaboración, aprovecho la ocasión para saludarle.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 4 de junio de 1990.
LA COORDINADORA DEL PROYECTO

Amelia Farres González-Saravia
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo.

AFGS*NLBB*1gg.



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DE BAJA CALIFORNIA SUR, A.C.

GOBIERNO DEL ESTADO
CONACYT
UNAM
UABCS
CICIMAR-IPN

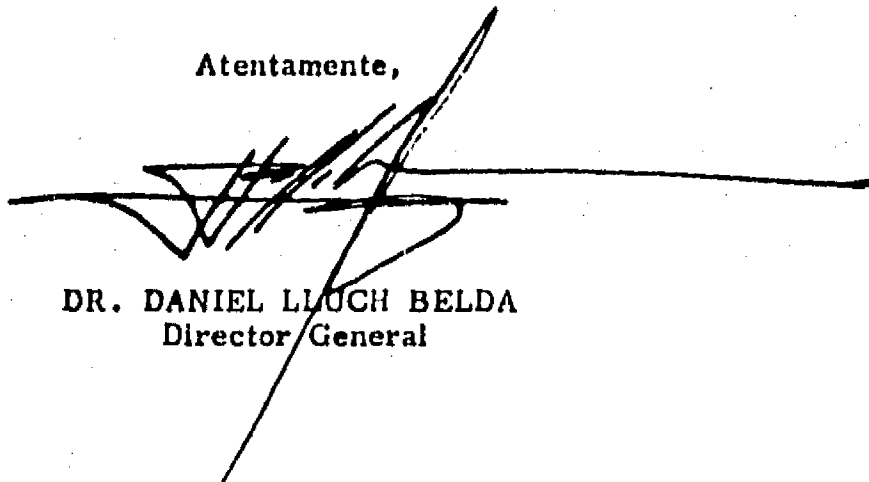
La Paz, B.C.S., Diciembre 12 de 1988.

DIRECCION GENERAL

CONSTANCIA DE PARTICIPACION

Por medio de la presente se hace constar que el M. en C.
FRANCISO VARGAS ALBORES participó activamente en "EL PRIMER
TALLER REGIONAL SOBRE ANALISIS DE LA PESQUERIA Y PERS-
PECTIVAS DE CULTIVO DE CAMARON EN BAJA CALIFORNIA SUR",
organizado por este Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S.,
A.C., y el Centro Regional de Investigaciones Pesqueras, durante
el periodo del 23 al 25 de noviembre de 1988.

Atentamente,



DR. DANIEL LLUCH BELDA
Director General

Cartel # 0022

Taller #1

Actividades Biológicas de la Hemolinfa de Camarón Azul
(*Penaeus stylirostris*)

Vargas-Albores, F., Guzmán, A. y Ochoa, J-L. Centro de Investigaciones Biológicas. Aptdo Postal 128. La Paz, B.C.S. 23000, México.

Los mecanismos de defensa en invertebrados involucran a moléculas de reconocimiento y células efectoras. La aglutinina sérica es el principal candidato como moléculas capaces de reconocer "lo propio" y "no propio". Con la intención de apoyar esta idea, y conociendo la existencia de actividad fagocítica aglutinante, en el presente trabajo se intenta observar la capacidad de la hemolinfa para "reconocer" bacterias marinas y de actuar como opsonina.

Como se demuestra por aglutinación directa o por absorción, la hemolinfa del camarón azul es capaz de interactuar con bacterias marinas. Utilizando eritrofagocitosis homóloga murina se observa que los macrófagos peritoneales incrementan su capacidad de adherir e incorporar glóbulos rojos del mismo animal, en presencia de la hemolinfa. Los resultados obtenidos incrementan la posibilidad de que la hemolinfa sea capaz de reconocer agentes patógenos y favorecer su eliminación por la células fagocíticas del camarón.

SOCIEDAD MEXICANA
DE INMUNOLOGIA, A. C.
VIII CONGRESO NACIONAL
ACEPTADO

San Luis Potosí, SLP 25-28 octubre 1989.

Exhibición del cartel jueves 26 9-11 hr

Cartel # 0023

Taller # 1

Actividad Hemaglutinante de la Hemolinfa de Comarón
(*Penaeus stylirostris*)

Vargas-Albores, F., Ochoa, J-L. Centro de Investigaciones Biológicas. Avda. Postal 128. La Paz, B.C.S. 23000, México.

Hace varias décadas se ha estudiado la actividad hemaglutinante de la hemolinfa y extractos tisulares de organismos invertebrados, llegando a sugerir la participación de aglutininas en los mecanismos de defensa de estos organismos. En este trabajo se describe algunas propiedades hemaglutinantes de la hemolinfa del camarón azul, y los primeros intentos en su aislamiento.

Los resultados obtenidos indican la presencia de una aglutinina con títulos que varían cuando se prueba con eritrocitos de diferentes especies. La actividad aglutinante también se puede modificar por el envejecimiento extracorpóreo de los eritrocitos o por tratamiento enzimático con tripsina. Algunas glicoproteínas y azúcares son capaces de inhibir la hemaglutinación.

La actividad hemaglutinante puede ser aislada por cromatografía de afinidad en Tetuin-Sepharose, siendo eluida con GII-HCl (0.1 M, pH=2.5) o con EDTA 10 mM. Esto último indica la necesidad de cationes divalentes para la aglutinación.

SOCIEDAD MEXICANA
DE INMUNOLOGIA, A. C.
VIII CONGRESO NACIONAL
ACEPTADO

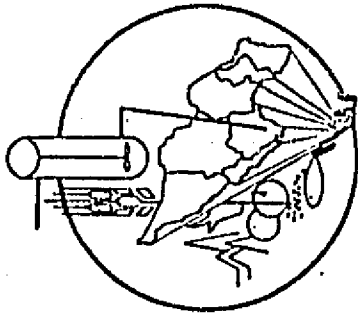
San Luis Potosí, SLP, 25-28 octubre 1989.

Exhibición del cartel jueves 26 9-11 hr

SIQ INSTITUTO TECNOLÓGICO de durango

SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGIA
Y BIOINGENIERIA. A. C.

II REUNION SOBRE INVESTIGACION Y DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGIA EN EL NORTE DE MEXICO.



BIOFERTILIZANTES MICROENCAPSULADOS HALOTOLERANTES.
Puentes, Pá-Esther, Antonia Guzmán-Parillo, Oscar
Montaño-Montaño, Francisco Vargas-Alborno, José-Luis Ochoa,
Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S., A.C.
División de Biología Experimental.
Ardo. Postal # 128, La Paz B.C.S., México 23000.

Con el propósito de obtener cepas de *Bradyrhizobium* sp. que sean altamente infectivas, se recolectaron nódulos de la leguminosa *Vigna uruiculata*. Los aislamientos se realizaron según la técnica descrita por Jordan (1984), obteniéndose 6 cepas con características macro y microscópicas de dicho género. A su vez se aislaron 6 cepas del suelo y se recibieron 6 más del IPI que se usaron como referencia. Los estudios de infectividad se efectuaron según la técnica descrita por Vincent (1981) contando medio nutritivo agar MS con 1% de NaCl y la leguminosa. Se inoculó 1 ml de cada una de ellas en fase log terminal con 5 repeticiones y se distribuyeron en el invernadero (65% HR, 25°C, fotoperíodo de 15 h luz durante 43 días). De dicho experimento se seleccionaron 6 cepas infectivas corroborándose esto, en otro experimento a nivel raceta con soporte tierra-vermiculita (v/v); inoculándose con cultivos líquidos y microencapsulados (atrapamiento de bacterias en alginato) regados con agua natural a 5,300 y 2,600 umbos/cm² con 5 repeticiones y comparando con un fertilizante comercial. Observándose al hacer el análisis estadístico (P 0.05), que los microencapsulados nos proporcionarían valores más altos de $\frac{1}{2}$ de nitrógeno en las plantas.

FACULTAD DE MEDICINA
DEPTO. DE BIOQUIMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Julio 23 de 1990.

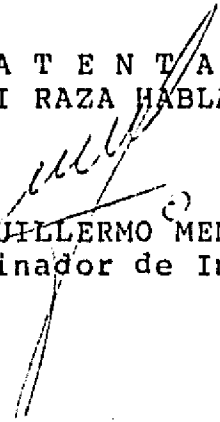
DR. FRANCISCO VARGA ALBORES
División Biotecnología
Centro de Investigaciones
Biológicas de B.C.S.
P r e s e n t e

El Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, agradece su participación en el ciclo de seminarios de investigación en el mes de julio del presente año, con la exposición del tema:

"INMUNIDAD EN INVERTEBRADOS"

Esperamos contar nuevamente con su valiosa colaboración en un futuro próximo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"


DR. GUILLERMO MENDOZA HDEZ.
Coordinador de Investigación

GMH/rmh



University of California at Davis and Fallen Leaf Lake
September 9-14, 1990

Organizer: Marilyn Etzler
Department of Biochemistry and Biophysics
University of California, Davis CA 95616, USA
Tel (916)752-3528 FAX (916)752-3085

August 24, 1990

Dear Interlec-12 Participant:

Thank you very much for submitting your abstract listed below. Your paper has been scheduled for presentation in the poster session. The posters can be set up as early as Sunday afternoon and will remain up for the entire time of the Davis portion of the meeting. Specific time has been scheduled on Monday afternoon and Tuesday and Friday mornings for viewing the posters, however we anticipate that meeting participants will also be viewing them at other times during the meeting.

The poster board dimensions are 4 feet by 4 feet and pins will be available in the poster session rooms. We have an outstanding group of meeting participants and have assembled an excellent scientific program that should touch on most aspects of lectin research. We look forward to seeing you here in California soon.

Sincerely yours,

Marilynn Etzler
Organizer, Interlec-12

ME:ja

Abstract schedule for poster presentation:

16. F. Vargas-Albores, A. Guzman, L. Vazquez and E. Zenteno. Hemagglutinins from two peneids shrimps hemolymph.



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DE BAJA CALIFORNIA SUR, A. C.

La Paz B.C.S. del 27 al 28 de octubre de 1990

GOBIERNO DEL ESTADO
CONACYT
UNAM
UABCS
CICIMAR-IPN

M.C. Francisco Vargas A.

Centro de Investigaciones Biológicas
de Baja California Sur A. C.

El comité organizador del II SIMPOSIUM EN BIOTECNOLOGIA MARINA
le agradece su participación al evento con la ponencia "INMUNOLOGIA
DE CAMARON".

Su ponencia contribuyó al éxito logrado en dicho evento. Por lo
cual le extendemos el presente reconocimiento.

Atentamente

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Coordinador

II Simposium en Biotecnología Marina



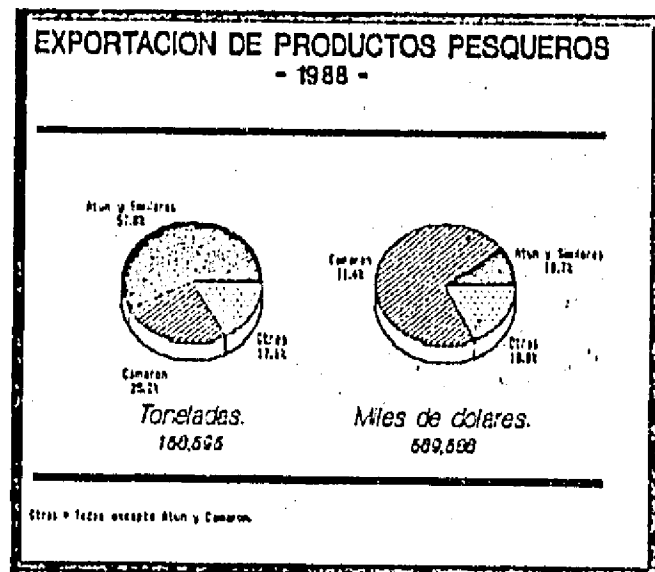
POSIBLES INDICADORES DE SALUD DE LOS CAMARONES Y SU APLICACION EN ACUACULTURA*

VARGAS ALBORES, F., GUZMAN MURILLO, A. Y OCHOA, J-L.
Centro de Investigaciones Biológicas de B.C.S. Apto. Postal 128,
La Paz, B.C.S., 23000, México.

RESUMEN

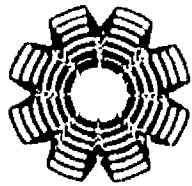
La condición fisiológica de los camarones, al igual que otros invertebrados, se ve influenciada por parámetros ambientales como la temperatura y la salinidad. La modificación de estos se asocia con la aparición de padecimientos en cultivos, ya sea por el crecimiento microbiano o por incremento en la susceptibilidad de los animales hacia las infecciones. La dificultad que existe para evaluar la condición del animal se ve incrementada debido a que los posibles indicadores del sistema de defensa parecen modificarse con la edad, talla o maduración. Dentro de los posibles indicadores que incluyen los niveles séricos de: actividad aglutinante, proteínas, carbohidratos, cationes, hemocitos y actividad fagocítica. Considerando que, el equilibrio homeostático deberá mantenerse y que esto lleva a la modificación de los parámetros hemáticos, el estudio de estos componentes séricos que pudieran verse afectados, como respuesta a las condiciones ambientales, puede servir para establecer las condiciones de salud de los animales.

Una de las actividades económicas más rentables dentro de la explotación de recursos marinos es la relacionada con el camarón. La captura y comercialización de este recurso en nuestro país ha sido de 75,000 toneladas anuales, en los últimos tres años. La exportación de 35,000 Ton./año, dentro del mismo período, representa para México un ingreso de divisas alrededor de 400,000 dólares por año.



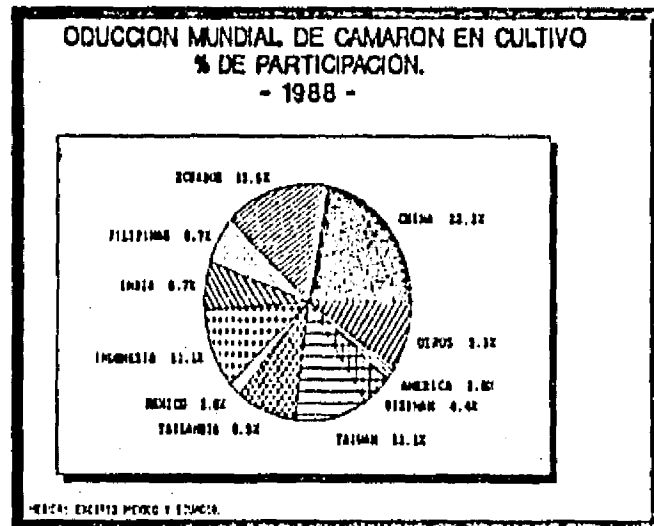
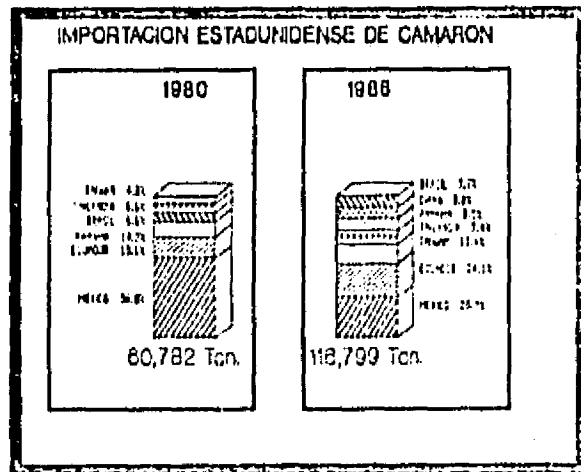
El principal mercado mexicano, los Estados Unidos, sigue demandando este recurso como se demuestra por el incremento en sus importaciones de 60,782 Tns en 1982, 116,799 en 1986 y casi las 200,000 para 1990. Sin embargo México se ha mantenido con un promedio de 35,000 Tns. puestas en el mercado estadounidense, lo que significa haber pasado del 56.8% de participación en 1980, al 28.9% en 1986. Es importante señalar que los otros

* Conferencia presentada dentro del II Simposium sobre Biotecnología Marina, celebrado el 27 y 28 de septiembre de 1990 en La Paz, B.C.S., México.



BIOTECNOLOGIA

países participantes de las importaciones estadounidenses mantienen un programa activo de cultivo de camarón, lo que les ha permitido aventajar al nuestro en el mercado del país vecino. La saturación de la capacidad de la flota camaronera y el atractivo mercado norteamericano están estimulando en México el cultivo del camarón, perfilándose como una actividad productiva de gran importancia económica.

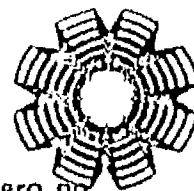


La contraparte radica en que el cultivo de camarón es una actividad de alto riesgo debido, fundamentalmente a la aparición y diseminación de enfermedades que llegan a afectar seriamente a la producción. Aunque se ha avanzado en el conocimiento de los parámetros ambientales del cultivo y en la identificación de organismos que los afectan, la presencia de padecimientos infecciosos, principalmente, sigue siendo un problema en acuicultura

debido a la ausencia de metodología en el diagnóstico temprano y tratamientos específicos. En la actualidad los sistemas de vigilancia del contenido biótico del cultivo se fundamentan en el análisis cualitativo y cuantitativo de los posibles patógenos, ya sea en el cuerpo de agua, en el cuerpo del animal o en ambos. Los protocolos incluyen, además del muestreo de agua, el diagnóstico macroscópico, sacrificio y, de ser necesario, la toma de muestras de las lesiones. Desafortunadamente, cuando los patógenos llegan a detectarse en el cuerpo del animal indican que parte de la población cultivada ya está afectada.

Para los cultivos intensivos, debido a la alta densidad de población, el desarrollo y la transmisión de patógenos toma dimensiones altamente peligrosa [1,2], por lo que un efectivo sistema de diagnóstico temprano, se traduciría en incentivos económicos al permitir mantener las enfermedades bajo control [3,4].

El control del número de microorganismo, se basa en el uso de antibióticos [5] y en la regulación de las características del agua. Esta metodología, además de ser costosa y poco



efectiva, puede controlar parcial y momentaneamente el problema infeccioso, pero no permite conocer la condición de salud de la población cultivada y nuevos cuadros infecciosos podrían presentarse.

Por otro lado, muchas infecciones, principalmente de origen bacteriano, son de etiología secundaria y concurren en síndromes como: deficiencia de ácido ascórbico, toxinas, heridas y estrés extremo [6,7]. Adicionalmente, algunos microorganismos considerados epicomensales pueden llegar a causar serios padecimientos en cultivos [8,9] cuando el estado de salud de los camarones no es adecuado.

De este modo, parece ser que el establecimiento de un cuadro infeccioso en el cultivo no se debe únicamente a un incremento numérico de los patógenos, sino que es altamente dependiente de la condición fisiológica de los animales. Además, cuando se establece un tratamiento para disminuir el número de patógenos, estamos modificando las características físicas y químicas del estanque y la conducta de la biota total del estanque, afectando también la fisiología de los camarones [10-12]. Esto puede reflejarse en la disminución del crecimiento, estrés y muda [13,14], lo cual impactará directamente en la productividad.

Hasta la fecha no se conoce una metodología precisa capaz de definir el estado de susceptibilidad de los camarones, hacia las infecciones. De poderse desarrollar se tendría la ventaja de regular paulatinamente las condiciones del estanque, evitar el estrés de los animales, retardar o prevenir la aparición y diseminación de la enfermedad.

Aunque se ha descrito la modificación de algunos componentes de la hemolinfa, principalmente aquéllos relacionados con los mecanismos de defensa, por la presencia de patógenos, hasta la fecha no ha sido posible establecer una correlación entre ellos y la susceptibilidad de los organismos para ser infectados. Uno de los principales problemas es la variación de la composición bioquímica y celular de los animales invertebrados de acuerdo a la edad, madurez, sexo y otros estados fisiológicos (muda). Dentro de los componentes de la hemolinfa que se han estudiado y que reflejan modificaciones fisiológicas, por estrés salino y de temperatura, o por infecciones se encuentran: la actividad aglutinante y lítica, la concentración de proteínas totales y hemocianina, así como la cantidad y tipo de hemocitos, como se detallan más adelante.

Los invertebrados carecen de un sistema inmune mediado por anticuerpos, pero poseen un efectivo sistema de protección que incluye lisis y aglutinación mediada por componentes humorales y celulares. La actividad hemaglutinante, se ha asociado con la capacidad de diferenciar lo propio de lo extraño y posiblemente las moléculas responsables sean lectinas [15-21], las cuales son glicoproteínas de alto peso molecular capaces de interactuar con residuos sacáridos sin modificarlos químicamente. Aunque restringidas en su especificidad a carbohidratos [15], la aglutinina sérica de los crustáceos, al igual que todos los invertebrados, tienen un papel importante en los sistemas de defensa [17-23] ya que son capaces de precipitar moléculas, aglutinar células y facilitar la fagocitosis [17,20,24,25]. La posibilidad de que estas moléculas puedan ser marcadores adecuados se incrementa al observar que la actividad y/o concentración de la lectina sérica puede ser modificada por la presencia de agentes patógenos [26-28].



En los invertebrados, la presencia de agentes infecciosos también puede modificar los niveles séricos de proteínas [25,26,29] y carbohidratos [29,30], debido posiblemente a la liberación de material de los tejidos dañados y la rápida utilización de los nutrientes por los patógenos [29,31].

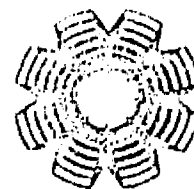
Adicionalmente, la concentración de proteínas séricas pueden también modificarse por efecto de la salinidad, como se ha podido establecer en el caso de *Orchestia gammarellus* [32], *Crasostrea virginica* [33,34], *Mytilus californianus* [36]. Del mismo modo, otros factores o estados fisiológicos también tienen efecto sobre la concentración de proteínas y/o azúcares séricos. Por ejemplo, en el camarón blanco, *Panaeus vanamei*, se pueden observar modificaciones tanto en el contenido sérico de proteínas y glucosa, en los diferentes estadios de muda [37] y por el tipo de dieta utilizada [38].

POSIBLES PARAMETROS INDICADORES DEL ESTADO DE SALUD DE LOS CAMARONES.

- Actividad Hemaglutinante.
- Concentración de Proteínas:
 - Totales
 - Coagulogeno
 - Cuproproteínas
 - Lipoproteínas
- Enzimas Séricas:
 - Fosfatasas
 - Lizosima
 - Amlasa
- Concentración de Azúcares Totales.
- Concentración de Iones:
 - Sodio
 - Potasio
 - Calcio
- Propiedades Físicoquímicas:
 - pH
 - Osmolaridad
- Células Circulantes (Hemocitos):
 - Totales (HT)
 - Granulares (HG)
 - Hialinos (HH)
 - Relación HG/HH
- Actividad Hemocítica:
 - Fagocitosis
 - Ocgranulación

Otro de los parámetros que posiblemente puedan servir para definir el estado de salud de los invertebrados incluyen concentraciones de iones, la osmolaridad y el pH, ya que éstos parecen tener un papel importante, principalmente en el mantenimiento del equilibrio electrolítico y osmótico. Los valores de estos parámetros pueden ser diferentes en los machos y en las hembras [39], o alterarse como respuesta a los cambios de salinidad y muda.

El estudio de los hemocitos, sus tipos y proporciones, es una posibilidad para el diseño de una metodología que permita evaluar la condición de salud de camarones cultivados, ya que las enfermedades infecciosas pueden modificar la concentración y distribución de los hemocitos de invertebrados [40-43]. Sin embargo, existen problemas para una acertada clasificación morfológica de las células circulantes, por lo que la metodología tediosa y costosa tiene que ser aplicada, como es el caso de la microscopía electrónica para los hemocitos de crustáceos-decápodos [44-46].



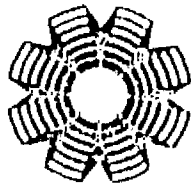
Aunque se han desarrollado varios estudios con la intención de caracterizar la población celular de la hemolinfa (44-48), estos no son conclusivos en cuanto a los criterios de diferenciación morfológica y poco se conoce sobre las modificaciones cualitativas y cuantitativas de los hemocitos por edad, sexo o madurez.

Independientemente de las diferencias morfológicas, una medición adecuada parece ser la determinación de la capacidad fagocítica (49-52), ya que representa la culminación de varios procesos celulares como son: locomoción, quimotaxis y reconocimiento. Sin embargo, la metodología no es fácil y, para el caso de los camarones, se requiere el establecimiento de un medio de cultivo adecuado para mantener viable a los hemocitos.

La susceptibilidad a enfermedades por alteración de las condiciones ambientales (temperatura y salinidad, principalmente) pueden ser explicadas por alteraciones en la función fagocítica y fenómenos relacionados. Por ejemplo, se ha observado en *Crassostrea virginica* que cuando se incrementa la temperatura se modifica la pinocitosis (53), migración y fagocitosis *in vivo* (54), unión de partículas (55), así como la velocidad para fagocitar bacterias *in vitro* (56). Rápidos incrementos en la salinidad retardan la migración y locomoción de los hemocitos (57). Estudios similares, con *Ostrea edulis*, han demostrado que la capacidad de los hemocitos para unir partículas extrañas *in vitro* decrece si se incrementa la temperatura o se baja la salinidad durante 4-8 horas (58).

Valores promedio (desviación estándar) de algunos parámetros Hemáticos medidos en el camarón azul (*Panacus stylirostris*)

	Hembras	Machos	Total
Proteína Total (mg/ml)	54.233 (15.026)	51.728 (16.162)	53.285 (15.513)
Actividad Hemaglutinante Log INV Tit.	4.490 (2.390)	4.290 (1.170)	4.410 (2.160)
pH	7.341 (0.217)	7.246 (0.203)	7.309 (0.217)
Sodio (meg/l)	448.522 (32.970)	453.429 (51.0.43)	454.162 (41.398)
Potasio (meg/l)	9.374 (1.857)	10.657 (1.447)	9.859 (1.823)
Osmolalidad (mOs/Kg)	858.700 (44.480)	886.430 (61.370)	869.190 (52.880)



BIOTECNOLOGIA

Por lo anterior, nosotros estamos desarrollando una metodología de diagnóstico rápido, preciso y sencillo que nos permita colaborar en el importante renglón económico del cultivo del camarón. Dentro de los posible parámetros estamos incluyendo la actividad hemaglutinante, la concentración de proteína y azúcares totales, la cuantificación de cationes, el conteo celular y la capacidad fagocítica.

Los resultados hasta la fecha son alentadores, ya que hemos podido demostrar la presencia de aglutininas séricas en el camarón café (*Panaeus californiensis*) y en el camarón azul (*P. stylirostris*), determinando algunas de sus propiedades aglutinantes y fisicoquímicas. Por otro lado, ha sido posible observar que la aglutinina del camarón azul, es capaz de interactuar con bacterias marinas, incluyendo aquellas descritas como patógenas para estos animales.

En lo referente a los componentes celulares, hemos podido establecer una metodología que nos permite, utilizando una muestra de 10-15 μ l de hemolinfa, cuantificar los hemocitos totales, así como identificar y cuantificar las diversas poblaciones (hialinas, granulares y subgranulares).

BIBLIOGRAFIA

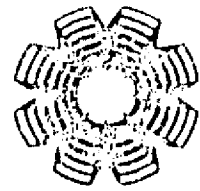
1. Neal, R.A. 1973. Alternatives in aquaculture development: consideration of extensive versus intensive methods. J. Fish. Res. Bol. Can. 30: 2218-2232.
2. Delves-Broughton, J. and Poupard, C.W. 1976. Disease problems of prawns in recirculation systems in the U.K. Aquaculture 7: 201-209.
3. Overstreet, R.M. 1973. Parasites of some penaeid shrimps with emphasis on reared host. Aquaculture 2: 105-112.
4. Couch, J.A. 1978. Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeid shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. Fish. Bull. 76: 1-30.
5. Lightner, D. 1985. Disease of cultured penaeid shrimp. In CRC Handbook of mariculture. Vol. 1. Crustacean aquaculture.. CRC Press. pp: 289-319.
6. Magarelli, P.L., Hunter, B., Lightner, D.V. y Calvin, L.B. 1979. Black death: an ascorbic acid deficiency disease in penaeid shrimp. Comp. Biochem. Physiol. 63A: 103-107.
7. Lightner, D.V., Hunter, B., Magarelli, P.L. y Calvin, L.B. 1979. Ascorbic acid; nutritional requirement and role in wound repair in penaeid shrimp. Proc. World Maricult. Soc. 10: 513-517.
8. Lightner, D.V. y Lewis, D.H. 1975. A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp, disease of crustaceans. Mar. Fish. Rev. 37: 25-30.
9. Fisher, W.S., Nilson, E.H., Steenbergen, J.F. and Lightner, D.V. 1978. Microbial diseases of cultured lobsters: a review. Aquaculture 14: 115-124.



10. Chan, E.S. and Lawrence, A.L. 1974. The effect of antibiotics on the respiration of brown shrimps larvae and postlarvae (Penaeus aztecus Ives) and the bacterial population associated with the shrimp. Proc. World Maricul. Soc. 5: 99-102.
11. Delves-Broughton, J. 1974. Preliminary investigations into the suitability of a new chemotherapeutic, Furanace, for the treatment of infectious prawn diseases. Aquaculture 3: 175-182.
12. Corliss, J.P. 1979. Accumulation and depletion of oxytetracycline in juvenile white shrimp Penaeus setiferus. Aquaculture 16: 1-6.
13. Corliss, J.P., Lighner, D. and Zein-Eldin, Z.P. 1977. Some effects of oral doses of oxytetracycline on growth, survival and disease in Penaeus aztecus. Aquaculture 11: 355-361.
14. Robaina, G.O. 1983. Effects of salinity and temperature in the survival of shrimp Penaeus brasiliensis Latreille (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Rev. Latinoam. Acuicul. 17: 25-37.
15. Yeaton, R.W. 1981. Invertebrate lectins: I. Occurrence. Develop. Comp. Immunol. 5: 391-402.
16. Yeaton, R.W. 1981b. Invertebrate lectins: II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. Develop. Comp. Immunol. 5: 535-545.
17. Rogener, W. y Uhlenbruck, G. 1984. Invertebrate lectins: The biological role of a biological rule. Develop. Comp. Immunol. 3s: 159-164.
18. Ratcliffe, N.A. 1985. Invertebrate immunity - A primer for the non-specialist. Immunol. Lett. 10: 253-270.
19. Renwanz, L. 1983. Involvement of agglutinins (lectins) in the invertebrate defense reactions: the immunobiological importance of carbohydrate specific binding molecules. Develop. Comp. Immunol. 7: 603-608.
20. Renwanz, L. 1986. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. Symp. Zool. Soc. Lond. 56: 81-93.
21. Sminia, T. y van der Knaap, W.P.W. 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. Develop. Comp. Immunol. 11: 17-28.
22. McKay, D. y Jenkin, C.R. 1970. Immunity in the invertebrates. The role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the crayfish (Parachanna bicarinatus). Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci. 48: 139-142.
23. Vasta, G.R. y Marchalonis, J.J. 1983. Humoral recognition factors in the arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins. Am. Zool. 23: 157-171.
24. Vasta, G.R., Sullivan, J.T., Cheng, T.C., Marchalonis, J.J. y Warr, G.W. 1982. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. J. Invertebr. Pathol. 40: 367-377.
25. Cheng, T.C. 1983. The role of lysosomes in molluscan inflammation. Am. Zool. 23: 129-144.
26. Cheng, T.C., Guida, V.G. y Gerhart, P.L. 1978. Aminopeptidase and lysozyme activity levels and serum protein concentration in Biorphalaria glabrata (Mollusca) challenged with bacteria. J. Invertebr. Pathol. 32: 297-302.
27. Wojdani, A., Stein, E.A., Lemmi, C.A. y Cooper, E.L. 1982. Agglutinins and proteins in the earthworm Lumbricus terrestris, before and after injection of erythrocytes, carbohydrates, and other materials. Dev. Comp. Immunol. 6: 613-624.
28. Babu, P.N.S. & Ray, K. 1988. Haemolymph response to the development of microfilariae of Wuchereria bancrofti in culex quinquefasciatus. Curr. Sci. 57: 276-278.
29. Mulvey, M. y Feng, S.Y. 1981. Hemolymph constituents of normal and Proctoeces maculatus infected Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol. 70A: 119-125.
30. Ishak, M.H., Mohamed, A.H. y Sharaf, A.A. 1975. Carbohydrate metabolism in uninfected and trematode-infected snails Biorphalaria alexandrina and Bulinus truncatus. Comp. Biochem. Physiol. 51: 499-505.
31. Becker, W. y Hirtbach, E. 1975. Effect of starvation on total protein and hemoglobin concentration in the hemolymph of Biorphalaria glabrata. Comp. Biochem. Physiol. 51: 809-814.



32. Spicer, J.J. & Taylor, C. 1987. Ionic regulation and salinity related changes in haemolymph protein in the semi-terrestrial beach flea Orchestia gammarellus (Pallas) (Crustacea: amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A: 243-246.
33. Swift, M.L. y Ahmed, M. 1983. A study of glucose, Lowry-positive substances, and triacylglycerol levels in the hemolymph of Crassostrea virginica (Gmelin). *J. Shellfish Res.* 3: 45-50.
34. Fisher, W.S. y Newell, R.I. 1986a. Salinity effects on the activity of granular hemocytes of American oysters, Crassostrea virginica. *Biol. Bull.* 170: 122-134.
35. Widdows, J. y Bayne, B.L. 1971. Temperature acclimation of Mytilus edulis with reference to its energy budget. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 51: 827-843.
36. Thompson, R.J., Bayne, C.J., Moore, M.N. y Carefoot, T.H. 1978. Haemolymph volume, changes in the biochemical composition of the blood, and cytological response of the digestive cells Mytilus californianus Conrad, induced by nutritional, thermal and exposure stress. *J. Comp. Physiol.* 127: 287-298.
37. Chan, S.M., Rankin, S.H. & Keeley, L.L. 1988. Characterization of the molt stages in Penaeus vanamei: ecdogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biol. Bull.* 175: 185-192.
38. Cruz-Ricque, L.E., Guillaume, J. & van Wormhoudt, A. 1989. Effect of squid extracts on time course appearance of glucose and free amino acids in haemolymph in Penaeus japonicus after feeding: preliminary results. *Aquaculture* 76: 57-66.
39. Naichi, M. y Alikhan, M.A. 1987. Haemolymph characteristics of a cooper-tolerant decapod Orconectes virilis (Hagen) (Astacidae, Crustacea). *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 95: 133-139.
40. Bang, F.B. 1971. Transmissible disease, probably viral origin, affecting the amoebocytes of the European shore crab Carcinus maenas. *Infect. Immun.* 3: 617-623.
41. Persson, M., Cerenius, L. & Soderhall, K. 1987. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, Pacifastacus lemilusculus Dana, to the parasitic fungus Aphanomyces astaci. *J. Fish Dis.* 10: 471-477.
42. Christensen, B.M., Huff, B.M., Miranpuri, G.S. Harris, K.L. & Christensen, L.A. 1989. Hemocytes population changes during the immune response of Aedes aegypti to inoculated microfilariae of Dirofilaria immitis. *J. Parasitol.* 75: 119-123.
43. Noda, S. & Loker, E.S. 1989. Phagocytic activity of hemocytes of M-line Biomphalaria glabrata snails: effect of exposure to the trematode Echinostoma parvaensei. *J. Parasitol.* 75: 261-269.
44. Martin, G.G. y Greaves, B.L. 1985. Fine structure and classification of shrimp haemocytes. *J. Morphol.* 195: 339-348.
45. Hose, J.E., Martin, G.G., Nguyen, V.N., Lucas, J. y Rosenstein, T. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocytes. *Biol. Bull.* 173: 178-187.
46. Tsing, A., Arcier, J-M. y Brehélin, H. 1989. Hemocytes of Penaeid and Palaemonid Shrimps: Morphology, cytochemistry, and hemograms. *J. Invertebr. Pathol.* 53: 64-77.
47. Bauch, A.G. and Plaquel, J.C. 1973. Variation du nombre de hémocytes chez les Crustacés Brachyours. *Crustaceana* 24: 215-223.
48. Dikkeboom, R., Tijnagel, J.M.G.H. & van der Knapp, W.P.W. 1988. Monoclonal antibody recognized hemocyte subpopulations in juvenile and adult Lymnaea stagnalis - Functional characteristics and lectin binding. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 17-32.
49. Rowley, A.F., Ratcliffe, N.A. 1979. An ultrastructural and cytochemical study of the interactions between latex particles and the haemocytes of the wax moth Galleria mellonella *in vitro*. *Cell. Tiss. Res.* 199: 127-137.



50. Berhelin, M. y Hoffman, J.A. 1980. Phagocytosis of inert particles in Locusta migratoria and Galleria mellanella: a study of ultrastructure and clearance. *J. Insect. Physiol.* 26: 103-111.
51. Fisher, W.S., Auffret, M. y Balouet, G. 1987. Acclimation of European flat oyster (Ostrea edulis) hemocytes to acute salinity and temperature changes. *Aquaculture* 67: 179-190.
52. Fisher, W.S. 1988. In vitro binding of parasites (Bonamia-Ostreae) and latex particles by hemocytes of susceptible and insusceptible oysters. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 43-53.
53. Feng, S.Y. 1965b. Pinocytosis of proteins by oyster leucocytes. *Biol. Bull.* 129: 95-105.
54. Feng, S.Y. y Feng, J.S. 1974. The effect of temperature on cellular reactions of Crassostrea virginica to the injection of avian erythrocytes. *J. Invertebr. Pathol.* 23: 22-37.
55. Fisher, W.S. y Tamplin, M. 1988. Environmental influence on activities and foreign-particles binding by hemocytes of american oysters, Crassostrea virginica. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1309-1315.
56. Foley, D.A. y Cheng, T.C. 1975. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods Crassostrea virginica and Merccenaria mercenaria. *J. Invertebr. Pathol.* 25: 189-197.
57. Fisher, W.S. y Newell, R.I. 1986b. Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate level in the hemolymph from American oysters (Crassostrea virginica Gmelin). *Comp. Biochem. Physiol.* 85A: 365-372.

ESTA
TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

VARIATION OF pH, OSMOLALITY, SODIUM AND POTASSIUM
CONCENTRATIONS IN THE HAEMOLYMPH OF SUB-ADULT BLUE SHRIMP
(*PENAEUS STYLIROSTRIS*) ACCORDING TO SIZE.

Francisco Vargas-Albores and José Luis Ochoa.

Division of Experimental Biology, Center of Biological Research, P.O. Box 128, La Paz, BCS, 23000, México.

RUNNING TITLE:

Osmotic-Ionic values in *Penaeus stylirostris*.

ABSTRACT:

1. Haemolymph pH, osmolality, as well as potassium and sodium concentration were determined in sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*).

2. The pH and concentration of sodium are not modified according to the size of sub-adult *P. stylirostris*. The mean for pH was 7.3, and the sodium concentration average was 450 meq.l⁻¹.

3. The haemolymph osmolality and the potassium concentration showed significant differences according to size.

4. The smaller shrimp are better osmoregulators.

5. Potassium has an important role in osmolality maintenance.

INTRODUCTION.

Osmotic regulation in shrimp is a physiological property which determines their distribution under different salinities. This osmoregulatory ability has been studied in many species, including: *P. aztecus* (Williams, 1960; McFarland and Lee, 1963; Bishop *et al.*, 1980; Castille and Lawrence, 1981a), *P. duorarum* (Williams, 1960; Bursey and Lane, 1971; Castille and Lawrence, 1981a), *P. esculentus* (Dall, 1981), *P. japonicus* (Thuet *et al.*, 1985), *P. merguensis* (Dall, 1981), *P. monodon* (Cawthorne *et al.*, 1983; Ferraris *et al.*, 1986), *P. penicillatus* (Cheng and Liao, 1986), *P. setiferus* (McFarland and Lee, 1963; Castille and Lawrence, 1981a), *P. stylirostris* (Castille and Lawrence, 1981a), and *P. vannamei* (Castille and Lawrence, 1981a). All of these species are euryhaline penaeids which inhabit brackish water as postlarvae and juveniles, but migrate as adults to a marine habitat. Nevertheless, shrimp at all stages of development are able to hyperregulate osmolality in diluted media and to hyporegulate in concentrated media with isosmotic concentrations at 20-30 parts per thousand. The juveniles are more euryhaline and stronger osmoregulators than the adults, although differences have been found between species (Charmanier, 1987).

The control of internal pH is necessary for the proper functioning of animals, since the pH of body fluids governs the ionization state of proteins, which in turn governs their physiological function (Reeves and Rahn, 1979). In crustaceans, including penaeids, some importance has been ascribed to the role of ion fluxes in pH regulation (Cameron, 1978; Truchot, 1979); however, the connection between the difference in ion concentration and pH is not yet clear.

Previous studies on *Penaeus* osmoregulation have relied on the physical transfer of the organism to different salinities and temperatures in order to determine the influence of medium changes on the haemolymph composition (Dall, 1981; Dall and Smith, 1981; Castille and Lawrence, 1981a; 1981b; 1981c; Cawthorne *et al.*, 1983; Charmantier, 1987). In contrast, shrimp for this study were obtained from only one marine location and without further manipulations. While previous studies compared shrimp of different stages in development, this study focused on three sizes of blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) from 11 to 16 cm. Shrimp of these sizes are all considered sub-adult (McFarland and Lee, 1963; Bursey and Lane, 1971).

Although sodium concentration and changes in osmolality have been reported for juveniles and adults (Castille y Lawrence, 1981b), potassium concentration and pH values have not been ascertained. Thus, the main objectives of this research were to determine the Na⁺ and K⁺ concentration, pH, and osmolality of the haemolymph from three sizes of sub-

adult *Penaeus stylirostris* for comparison with previous reports on *Penaeus* osmoregulation.

MATERIALS AND METHODS.

Shrimp and haemolymph collection.

Male and female shrimp (*Penaeus stylirostris*) were collected from San Carlos Bay, B.C.S., México, in October of 1989. The water temperature was 21°C with a salinity of 36 parts per thousand (ppt). The haemolymph (50-200 µl) was obtained by inserting a sterile 25 gauge needle in the pleopod base of the first abdominal segment. Each sample was put into 1.5 ml Eppendorf tube and kept at 10°C for transporting. In the laboratory, the cell-free haemolymph, or serum, was recovered after centrifugation for 10 minutes in an Eppendorf microfuge and removal of the cell clot. Only the haemolymph from intermoult shrimp was used.

Chemical Analysis.

The serum osmolality (mOsm/Kg) was measured on a Wescor 5120B Vapor Pressure Osmometer which had been calibrated with standard solutions of 100, 290 and 1000 mOsm.Kg⁻¹. The serum pH was determined using a surface electrode. Haemolymph sodium and potassium concentration (mEq.l⁻¹) was determined on a Radiometer, FLM 3 flame photometer.

	Male (n = 13)	Female (n = 20)
pH	7.25 ± 0.14	7.33 ± 0.14
Sodium (meq.l ⁻¹)	460.46 ± 18.38	452.30 ± 16.09
Potassium (meq.l ⁻¹)	10.19 ± 0.62	10.18 ± 0.87
Osmolality (mOsm.Kg ⁻¹)	826.74 ± 39.44	827.41 ± 46.46
Mean ± standard deviation.		

Table 1. Parameters determined in sub-adult *Penaeus stylirostris* haemolymph. No significant difference ($P > 0.05$) between sexes was obtained by t-test.

	Male	Female	Male & Female
pH	0.0439	0.0672	0.0480
Sodium	0.4745	0.2445	0.3163
Potassium	0.4771	0.5560	0.5312
Osmolality	0.3149	0.6229	0.5265

Table 2. Linear correlation factors between evaluated haemolymph parameters and size of *P. stylirostris* male, female and mixed population.

Experimental Design.

To determine the influence of animal size on serum K^+ and Na^+ concentration, as well as the haemolymph pH and osmolality, the whole shrimp population and each sex was separated into three groups of different sizes: Group A was comprised of animals ranging in size from 11.0 to 12.6 cm; group B from 12.7 to 14.3 cm and group C from 14.4 to 16 cm.

The data obtained were analyzed ANOVA-1W (Analysis of variance one way), t-Student or lineal regression, using Lotus 1-2-3TM and StatgraphicsTM programs.

RESULTS

The haemolymph pH, osmolality, sodium, and potassium concentration of the shrimp, ranging from 11 to 16 cm, and weighing between 11.8 and 27.2 g, are

shown in table 1. The t-test analysis of these parameters did not indicate significant differences ($P < 0.10$) between male and female values.

As expected, a good correlation between size and weight was observed in both male ($r = 0.8953$), and female ($r = 0.9632$), as well as in mixed populations ($r = 0.9393$). For this reason, further comparisons are made referring to size only and assuming that similar results could be obtained with reference to weight.

A poor correlation between size (or weight) and pH, osmolality or ion concentration was found when the data were analyzed separately for female, male, or mixed shrimp populations (table 2). Nevertheless, despite the lack of good correlation between the size and potassium ($r = 0.5312$) or osmolality ($r = 0.5265$), some other variations were noticed according to the animal size. For potassium ion serum level and osmolality, a positive tendency was observed, in-

	Group A 11.0-12.6 cm (n = 10)	Group B 12.7-14.3 cm (n = 16)	Group C 14.4-16.0 cm. (n = 7)
pH	7.29 (0.18)	7.32 (0.13)	7.28 (0.16)
Sodium	448.20 (18.94)	456.12 (16.02)	464.57 (17.80)
Potassium	9.72 (0.71)	10.22 (0.75)	10.77 (0.62)
Osmolality	794.79 (28.42)	835.00 (45.02)	855.42 (38.03)

* Significantly different ($P < 0.05$) by ANOVA-1W.

Table 3. Values (SE) of the parameters studied in the *Penaeus stylirostris* haemolymph. The shrimp were separated into groups according to size.

	Group A 11.0-12.6 cm	Group B 12.7-14.3 cm	Group C 14.4-16.0 cm.
MALE			
pH	7.17 (0.23)	7.29 (0.14)	7.28 (0.07)
Sodium	445.33 (15.01)	464.29 (17.53)	466.67 (24.44)
Potassium	9.43 (0.35)	10.43 (0.64)	10.40 (0.01) ^a
Osmolality	776.00 (13.06)	850.05 (35.30)	823.11 (20.51) ^a
FEMALE			
pH	7.35 (0.13)	7.34 (0.13)	7.28 (0.24)
Sodium	449.43 (21.38)	449.78 (12.14)	463.00 (15.10)
Potassium	9.84 (0.81)	10.06 (0.83)	11.05 (0.72)
Osmolality	802.84 (30.04)	823.29 (50.13)	879.66 (28.01) ^b

Table 4. Values (SE) obtained in male and female shrimp separated according to animal size. The groups are compared using ANOVA, and the row with significant different ($P < 0.05$) is marked with (*). Differences between sexes were established for each size group using t-test and the significantly different ($P < 0.05$) is indicated with superscript letters.

dicating a size dependency. When these data are evaluated according to sex, it was observed that the contribution by male and the female is different. For potassium, the female showed a better correlation ($r = 0.5560$) than the male ($r = 0.4712$). In a similar manner, osmolality exhibited a superior correlation ($r = 0.6228$) for female than for male shrimp ($r = 0.3149$).

To determine the influence of animal size on serum K^+ and Na^+ concentration, as well as the haemolymph pH and osmolality, the whole shrimp population was separated into three groups according to size. Tested by ANOVA-1W, significant differences ($P < 0.05$) in both potassium level and osmolality were observed (table 3). On the other hand, serum sodium level and haemolymph pH did not show significant differences ($P > 0.10$).

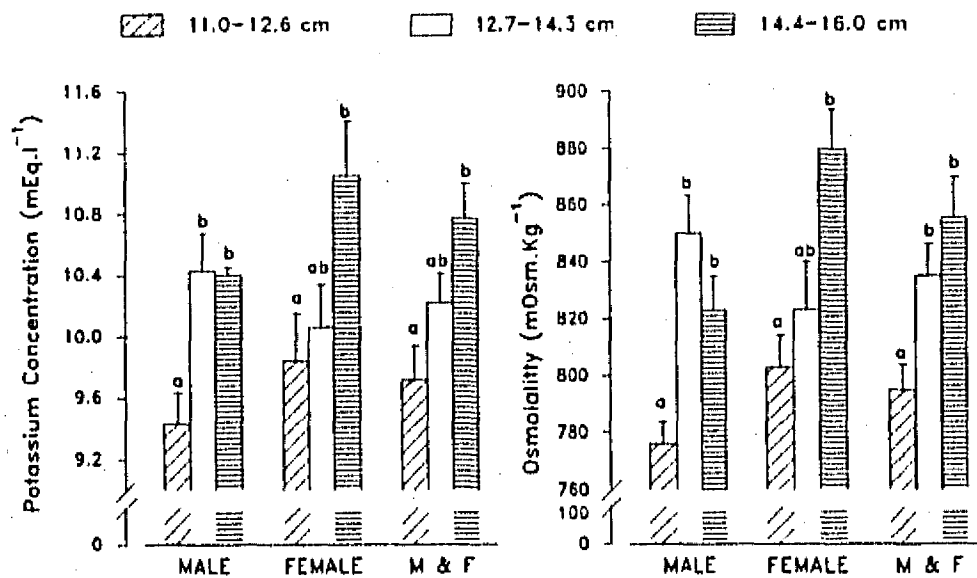


FIGURE 1. The haemolymph osmolality and K^+ concentration for male, female and mixed-sex blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. Mean \pm S.E. are given by the diagram. Significant differences are indicated by letters.

Similar results were obtained when the data were analyzed according to sex (table 4). For the male, a significant difference ($P < 0.05$) was found in potassium level and osmolality according to their size. However, the female shrimp only showed significant variations in osmolality ($P = 0.024$), but not in potassium level ($P > 0.05$). Using the *t*-test, each group was analyzed for differences between male and female. As shown in table 4, significant difference was only observed in the osmolality values of group C (14.4 to 16 cm). An increase in potassium concentration and osmolality was observed according to animal size in male, female and both together (figure 1). The relationship between the monovalent cation (Na^+ and K^+) concentration and osmolality was found using the ratio $[\text{Na}^+]/[\text{K}^+]$. As shown in figure 2, a good correlation is observed, indicating that osmolality is largely dependent on these cation concentrations.

DISCUSSION

The osmoregulatory abilities of euryhaline penaeids can be correlated with their distribution in environments of different salinity (McFarland and Lee 1963). However, there are many factors other than salinity or osmoregulatory ability *per se* that might determine the distribution of the shrimp population (Dall, 1981). Castille and Lawrence (1981b) pointed out that this migratory behavior is not directly related to osmotic regulation capability since adult animals are still capable of hyperosmotic regulation at salinities below the isosmotic point. However, adult migrations to water of high salinity may be necessary for ovarian development (Chu and Hanaoka, 1975; Oshiro, 1984), spawning (Panikkar, 1968), and for embryonic and larval development (Lim, 1982).

It has been suggested that maximum growth of an organism occurs in isosmotic media, since the animal would be expending the least energy in osmotic regulation (Panikkar, 1968). This may be true in *P. vannamei* and *P. stylirostris* but not in *P. aztecus*, *P.*

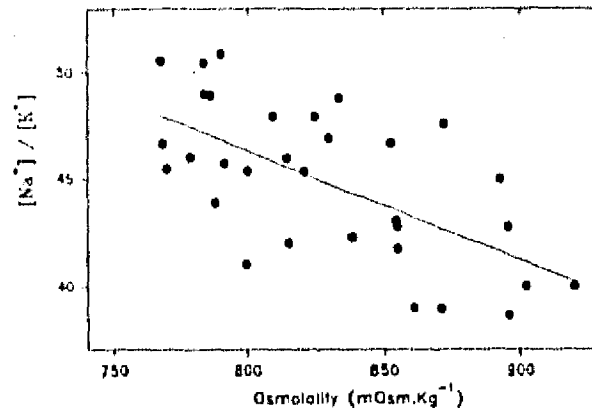


FIGURE 2. Linear correlation between the osmolality and Na^+/K^+ ratio of the *Penaeus stylirostris* haemolymph. $r = 0.6415$; $n = 33$.

douranum and *P. setiferus* (Zein-Eldin, 1963). Moreover, the salinity itself has little effect on the metabolic rate of euryhaline shrimp (Kutty *et al.*, 1971; Bishop *et al.*, 1980; Gaudy & Sloane, 1981), indicating that the energy required for osmoregulation may be relatively small.

The results using sub-adult *P. stylirostris* animals from one oceanic location (salinity = 36 ppt) show a variation in the haemolymph osmolality according to animal size. This contrasts to the findings of Castille and Lawrence (1981b) who reported that in *P. stylirostris*, the osmoregulatory capacity is the same for juveniles and adults animals at salinities of 36.2 ppt. This difference can be due, in part, to the shrimp populations used for study. While Castille and Lawrence studied juveniles (68 mm) and adults (174 mm) from different sources and transferred them to 36.2 ppt salinity, we used wild animals from one location without acute salinity transfer.

Other penaeid species like *P. aztecus* (Williams, 1960; McFarland and Lee, 1963; Castille and Lawrence, 1981a), *P. duorum* (Williams, 1960; Bursey and Lane, 1971; Castille and Lawrence, 1981a), *P. esculentus* (Dall, 1981), *P. japonicus* (Thuet *et al.*, 1985), *P. merguensis* (Dall, 1981), *P. monodon* (Cawthorne *et al.*, 1983; Ferraris *et al.*, 1986), *P. plebejus* (Dall, 1981), *P. penicillatus* (Cheng and Liao, 1986),

P. setiferus (McFarland and Lee, 1963; Castille and Lawrence, 1981a), and *P. vannamei* (Castille and Lawrence, 1981a), display an important variation in the osmoregulatory capacity according to the age of the animal. In all of these species, juvenile animals are better regulators than adults. For salinities above their isosmotic point, adult shrimp show a higher hemolymph osmolality than juveniles. Because the isosmotic point of *P. stylirostris* is near 24 ppt or 699 mOsm.Kg⁻¹ (Castille and Lawrence, 1981a) at 36 ppt (1020 mOsm.Kg⁻¹), the animal is under osmotic stress. In this condition the haemolymph osmolality of the larger shrimp must be greater than that of the smaller shrimp. This suggests that smaller shrimp have a better osmoregulatory capacity.

Our results support this idea, because the osmolality of the bigger shrimp (855.42 ± 38.03 mOsm.K⁻¹) is significantly ($P < 0.01$) higher than that of smaller shrimp (794.79 ± 28.42 mOsm.K⁻¹). This phenomena can be observed in the whole population, as well as in the males and females when the data are analyzed separately. As shown in table 4, no significant differences between males and females were observed in animals with of than 14.3 cm in length (group A and B); however, in group C (14.4-16 cm), a significant difference was found ($P < 0.05$). Furthermore, a clear difference between group A (11-12.6 cm) and group C (14.4-16 cm) was demonstrated for both sexes.

The sodium and/or potassium haemolymph concentrations were modified according to the concentration of these ions in the external medium. This has been demonstrated in some penaeids: *P. aztecus*, *P. duorarum*, *P. esculentus*, *P. merguensis*, *P. plebejus*, *P. setiferus*, *P. stylirostris* and *P. vannamei* (Castille and Lawrence, 1981b; Dall & Smith, 1981), and variations between species can be noted. Despite these variations, the curves for anions are similar in shape to those for the osmotic concentrations, indicating that ions are the major contributors to osmotic maintenance (Dall, 1981).

In this work, no modification in the ionic composition of the environmental was made. However, differences in the haemolymph ionic composition was observed which were similar to osmolality. While there was no difference in the sodium concentration, the potassium was significantly different ($P < 0.05$) in the three groups studied. This result is analogous to those obtained in other *Penaeus* (Dall and Smith, 1981; Castille and Lawrence, 1981b, Charmantier, 1987), with respect to the proportionate increases in ionic concentration and osmolality. Thus, small shrimp (11 to 12.6 cm), which are better osmoregulators, show less haemolymph potassium concentration (9.72 meq.l⁻¹) than the shrimp of 14.4 cm or more (10.77 meq.l⁻¹). This difference is very significant ($P < 0.02$).

Castille and Lawrence (1981a) reported that sodium and chloride ions account for 76-94% of the haemolymph osmotic pressure in several penaeid species. However, only *P. aztecus* and *P. duorarum* of the genus *Melicerus* increased the sodium and chloride contribution to the hemolymph osmotic pressure when environmental salinity increased. Penaeids of the subgenus *Littopenaeus*, which are better osmoregulators, apparently rely on other methods to minimize fluctuations in hemolymph osmolality during variations in external salinity (Castille & Lawrence, 1981a). According to this idea, the potassium ions make an important contribution to the osmotic equilibrium of the sub-adult *P. stylirostris*. The combination of K⁺ with other major ions, like Na⁺, seems to be an adequate measure, and the [Na⁺]/[K⁺] ratio confirm this hypothesis (figure 2).

In sum, osmoregulatory ability has been demonstrated in both juvenile and adult (Castille y Lawrence 1981b), as well as pre-adult *P. stylirostris* (this work) suggesting that the migration to or from offshore waters is not directly necessitated by osmotic regulation. Although there are differences between species, this is a general characteristic of migratory penaeids and this capability is greater in the early stages.

ACKNOWLEDGEMENT.

We would like to thank Ms Antonia Guzmán for assistance with the assays. Fernando Vega and Victor Oseguera kindly helped with the shrimp collections and classification. We are grateful to Dr. Roberto Civera for valuable comments and to Roy Bowers for grammatical review.

REFERENCE

- Bishop J. M., Gosselink J. G. and Stone J. H. (1980) Oxygen consumption and hemolymph osmolality of brown shrimp, *Penaeus aztecus*. *Fish. Bull.* 78, 741-757.
- Burse C. R. and Lane C. E. (1971) Ionic and protein concentration changes during the molt cycle of *Penaeus douranum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A, 155-162.
- Cameron J. N. (1978) Effect of hypercapnia of blood acid-base status, NaCl fluxes, and trans-gill potential in freshwater blue crabs, *Callinectes sapidus*. *J. Comp. Physiol.* 123, 137-141.
- Castille F. L. Jr and Lawrence A. L. (1981a) The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A, 75-80.
- Castille F. L. Jr and Lawrence A. L. (1981b) A comparison of the capabilities of juvenile and adult *Penaeus setiferus* and *Penaeus stylirostris* to regulate the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A, 677-680.
- Castille F. L. Jr and Lawrence A. L. (1981c) A comparison of the osmotic, sodium and chloride concentrations in urine and hemolymph of *Penaeus setiferus* (L.) and *Penaeus stylirostris* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol.* 70A, 525-528.
- Cawthorne D. F., Beard T., Daveport J. and Wickins J. F. (1983) Responses of juvenile *Penaeus monodon* Fabricius to natural and artificial sea waters of low salinity. *Aquaculture* 32, 165-174.
- Charmantier G. (1987) L'osmoregulation chez les crevettes Penaeidae (Crustacea, Decapoda). *Océanis* 13, 179-196.
- Cheng J. H. and Liao I. C. (1986) The effect of salinity on the osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Penaeus monodon* and *P. penicillatus*. In *The first Asian fisheries forum* (Edited by Maclean J. L., Dizon L. B. and Hosillos L. V.), pp. 633-636. Asian Fish. Soc. Manila, Philippines.
- Chu S. H. and Hanaoka T. (1975) Changes of serum osmotic pressure in the prawn *Penaeus japonicus* and the king crab, *Paralithodes camtschatica* in relation to gonadal maturation. *J. Fish. Soc. Taiwan* 4, 13-17.
- Dall W. (1981) Osmoregulatory ability and juvenile habitat preference in some Penaeid prawns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 54, 55-64.
- Dall W. and Smith D. M. (1981) Ionic regulation in four species of Penaeid prawns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 55, 219-232.
- Ferraris R. P., Parado-Esteva F. D., Ladja J. M., and de Jesus E. G. (1986) Effect of salinity on the osmotic chloride, total protein and calcium concentrations in the hemolymph of the prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). *Comp. Biochem. Physiol.* 83A, 701-708.
- Gaudy R. and Sloane L. (1981) Effect of salinity on oxygen consumption in postlarvae of the penaeid shrimp *Penaeus monodon* and *P. stylirostris* without and with acclimation. *Mar. Biol.* 65, 297-301.
- Kutty M. N., Murugapopathy G. and Krishnan T. S. (1971) Influence of salinity and temperature on the oxygen consumption in young juvenile of the Indian prawn *P. indicus*. *Mar. Biol.* 11, 125-131.
- Lim M. Y. (1982) Salinity tolerance of three species of shrimps: *Penaeus japonicus*, *P. monodon* and *P. semisulcatus* during larval development. *China Fish. Mon.* 356, 21-25.
- McFarland W. N. and Lee B. D. (1963) Osmotic and ionic concentrations of Penaeidean shrimps of the Texas Coast. *Bull. mar. Sci.* 13, 391-417.
- Oshiro T. (1984) Optimum NaCl concentration of the incubation medium for incubation of oocytes meiotic maturation in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, *in vitro*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult. (Japan)* 6, 77-84.
- Panikkar N. K. (1968) Osmotic behavior of shrimps and prawns in relation to their biology and culture. *FAO Fish. Rep.* 57, 527-538.
- Reeves R. and Rahn H. (1979) Patterns in vertebrate acid-base regulation. In *Evolution of respiratory processes, a comparative approach* (Edited by Wood S. C. and Lenfant C.), pp. 225-252. Marcel Dekker, New York.
- Thuét T., Hackman R. G. and Trilles J. P. (1985) Etudes des caractéristiques l'osmoregulation des post-larves de *Penaeus japonicus* dans des milieux de salinité et température variables. *Rapp. Gis-Arm-Cephalmar* 1984, 1-16.
- Trouchet J. P. (1979) Mechanisms of the compensation of blood respiratory acid-base disturbances in the shore crab *Carcinus maenas* L. *J. Exp. Zool.* 210, 407-416.
- Williams A. B. (1960) The influence of temperature on osmotic regulation in two species of estuarine shrimps (*Penaeus*). *Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole* 119, 560-571.
- Zein-Eldin Z. P. (1963) Effect of salinity on the postlarval penaeid shrimp. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole* 125, 188-196.

**SIZE-DEPENDENCE HAEMAGGLUTINATING ACTIVITY
IN THE HAEMOLYMPH FROM
SUB-ADULT BLUE SHRIMP (*PENAEUS STYLIROSTRIS* STIMPSON).**

Francisco Vargas-Albores, Antonia Guzmán and José Luis Ochoa.

Division of Experimental Biology, Center of Biological Research, P.O. Box 128, La Paz, BCS, 23000, México.

RUNNING TITLE:

Haemagglutinating activity in *Penaeus stylirostris*.

ABSTRACT

1. The blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) haemolymph is capable of agglutinating the red blood cells of several vertebrates to different titers. However, the haemagglutinin is considered non-specific because it is incapable of differentiating erythrocytes of human blood types A,B and O.

2. Haemagglutinating activity and serum protein content were determined for male and female blue shrimp ranging in size from 8.5 to 16 cm. Haemagglutinating activity decreased significantly with animal size, while protein content was unaffected.

3. The above finding is probably related to maturation of the immune system and could explain the higher susceptibility of young shrimp to parasitic and viral diseases.

INTRODUCTION.

The haemolymph of invertebrates contains agglutinins which have been proposed as an important component of its humoral defense system in contrast to vertebrate response which is characterized by immunoglobulins (Rögner and Uhlenbruck, 1984; Vasta and Marchalonis, 1983; Vasta *et al.*, 1984b; Ratcliffe, 1985; Renwratz, 1983, 1986; Sminia and van der Knaap, 1987; Olafsen, 1988). These agglutinins have the ability to precipitate glycoconjugates and to agglutinate cells, bacteria (Bayne, 1980), virus (McCumber *et al.*, 1979) and protozoa (Pereira *et al.*, 1981). In this way, they facilitate phagocytosis by opsonization (Coombe *et al.*, 1984; Renwratz and Mohr, 1978; Rögner and Uhlenbruck, 1984), or by locating on the haemocyte surface (Vasta *et al.*, 1982, 1984a; Richards and Renwratz, 1991).

The involvement of agglutinins in the defense system of invertebrates has been supported by studies on the regulation of the synthesis of these proteins after challenging the animal by injury or pathogens (Komano *et al.*, 1980, Kubo *et al.*, 1984) and by studies that show changes in the serum level of haemagglutinating activity during infection (Loker and Hertel, 1987; Couch *et al.*, 1990). However, only a few studies have been published on changes in haemagglutinating activity during the course of development, or when

influenced by the age, sex, or size of the animal (Komano *et al.*, 1980, 1983; Bellah *et al.*, 1988; Muramoto *et al.*, 1991).

Although some serum agglutinins have been studied and characterized from marine crustaceans such as *Homonis americanus* (Hall and Rowlands, 1974), *Macrobrachium rosenbergii* (Vasta *et al.*, 1983) and *Cancer antenarius* (Ravindranath *et al.*, 1985), little information is available about the serum level or activity of these proteins. This study (1) determines the presence of haemagglutinating activity in the blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) haemolymph and evaluates its reaction against human and animal erythrocytes, (2) measures the total protein and haemagglutinin in the haemolymph of this decapod, and (3) correlates these values according to shrimp size.

MATERIALS AND METHODS.

Shrimp collection and haemolymph extraction.

Male and female shrimp (*Penaeus stylirostris*) were collected from San Carlos Bay, B.C.S., México. The water temperature was 21°C with a salinity of 36 parts per thousand (ppt). The haemolymph (50-200 µl) was obtained as previously described (Vargas-Albores and Ochoa, 1992) by inserting a sterile 25 gauge needle in the pleopod base of the first abdominal segment. Each sample was put into a 1.5 ml Eppendorf tube and kept at 10°C for transporting. In the laboratory, the cell-free haemolymph, or serum, was recovered by centrifugation for 10 minutes in an Eppendorf microfuge and subsequent removal of the cell clot. Only the haemolymph from intermoult shrimp was used. For the haemagglutination experiments, we pooled the haemolymphs of 40 shrimp (male and female), obtained as described above.

Experimental Design.

To determine the influence of animal size on total serum protein concentration and haemagglutinating ac-

tivity, the whole shrimp population and each sex was separated into three groups of different sizes: Group A was comprised of animals ranging in size from 8.5 to 11.0 cm; group B from 11.1 to 13.5 cm, and group C from 13.6 to 16 cm.

Statistical comparison was accomplished using one-way analysis of variance (ANOVA-1W) or Student's *t* test. Statistical differences between groups were determined using Duncan's multiple range test (Sokal and Rohlf, 1981). Differences were considered to be significant if the *P* value was less than 0.05.

Chemical Analysis.

The total protein content was measured according to Lowry *et al.*, (1951) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Haemagglutination test.

The human and animal blood samples (except for mice) were obtained by venous puncture, then collected and stored in sterile Alsever's solution. The mouse blood was obtained by cardiac puncture and stored the same way. Before using, the cells were washed twice by centrifugation (800 g, 10°C, 10 min) with saline solution (NaCl 0.15 M) and twice with TRIS buffered saline plus calcium (TBS-Ca: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.5). Finally, the red blood cells (RBC) were suspended to 2% (v/v) in TBS-Ca. The haemagglutination assays

Erythrocyte	Titer	RHA
Human A	1:32	1.0
Human B	1:32	1.0
Human O	1:32	1.0
Cow	1:8	0.2
Duck	1:8	0.2
Mouse	1:256	8.0
Rabbit	1:16	0.5
Rat	1:8	0.2
Sheep	1:8	0.2

Table 1. Haemagglutinin activity of the Blue Shrimp hemolymph against human and other animals erythrocytes. RHA = Relative Haemagglutinating Activity (Human = 1.0).

were performed on U-plates (Falcon). Two-fold serial dilutions of the shrimp serum were made in 25 μ l of TBS-Ca; then, 25 μ l of a 2% suspension of erythrocytes were added. The plates were incubated at room temperature ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) for one hour. The control was the substitution of shrimp serum by TBS-Ca. The agglutination titer was recorded as the reciprocal of the last dilution, giving evidence of agglutination at one hour of incubation.

RESULTS

Preliminary experiments showed that the blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) haemolymph is able to agglutinate human and other animal erythrocytes. The buffer used in the haemagglutination test was supplied with 10 mM Ca^{2+} because in crustaceans, this cation is depleted during clot formation (Durliat and Vranckx, 1981). In addition, a reduction in the haemagglutinating activity was observed when the haemolymph was dialyzed against EDTA. To prove the presence of haemagglutinating activity on the blue shrimp haemolymph, the serum from 40 shrimp (male and female) was pooled. A panel of erythrocytes from human and six other species of vertebrates was used to determine the specie/type selectivity of this haemagglutinating activity. Apparently, the haemagglutinating activity was not specific because human RBC of types A, B and O were agglutinated in the same way (Table 1). On the other hand, the blue shrimp haemolymph displayed the highest agglutinability against mouse erythrocytes but did not react with horse RBC. All other erythrocytes from the

tested animal species exhibited lower titer than human RBC.

The haemolymph of 23 female and 14 male shrimp were used to determine individual haemagglutinating activity and total protein. Shrimp ranged in size between 8.5 and 16 cm, weighing between 5.4 and 27.2 g. The data obtained are shown in Table 2. The results, analyzed by ANOVA test, do not indicate significant sex differences ($P > 0.10$) for either protein content or haemagglutinating activity.

As expected, a good correlation between size and weight was observed in both male ($r = 0.9295$), and female ($r = 0.9652$), as well as in mixed populations ($r = 0.9502$). For this reason, further comparisons refer to size only, assuming that similar results could be obtained with reference to weight. In contrast, a poor correlation between size (or weight) and haemagglutinating activity or protein content was found when the data were analyzed separately for female, male, or mixed shrimp populations. Nevertheless, despite the lack of a good linear correlation between size and haemagglutinating activity ($r = -0.5312$), a negative tendency was observed, indicating a size dependency (Figure 1).

To confirm this, the animals were classified into three groups according to size: A (8.5 to 11 cm), B (11.1 to 13.5 cm), and C (13.6 to 16 cm) and their corresponding data were analyzed by ANOVA one way. The results showed important significant differences ($P = 0.0013$) in haemagglutinating activity levels

	Male (n = 14)	Female (n = 23)	P
Size (cm)	12.93 \pm 1.49	12.65 \pm 1.99	
Weight (g)	15.59 \pm 5.06	15.50 \pm 5.70	
Total Protein (g/l)	53.05 \pm 7.92	53.69 \pm 7.19	0.8029
Haemagglutinating Activity	4.36 \pm 1.55	4.65 \pm 2.33	0.2163

Table 2. Total protein content and haemagglutinating activity (mean \pm std. deviation) of the blue shrimp haemolymph. The titers are expressed as the inverse of maximum dilution which gives positive agglutination. Differences (P) were established by *t* Student's test.

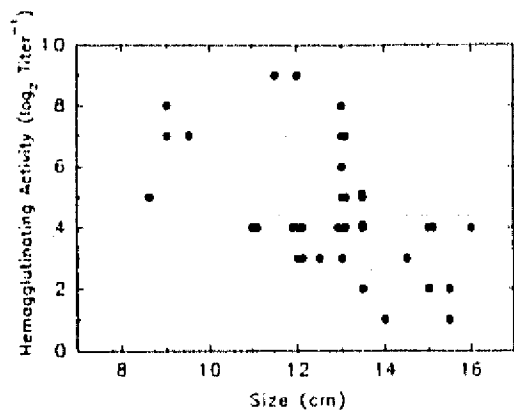


Figure 1. Haemagglutinating activity of the blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) haemolymph. The dotted line represent the mean of all data.

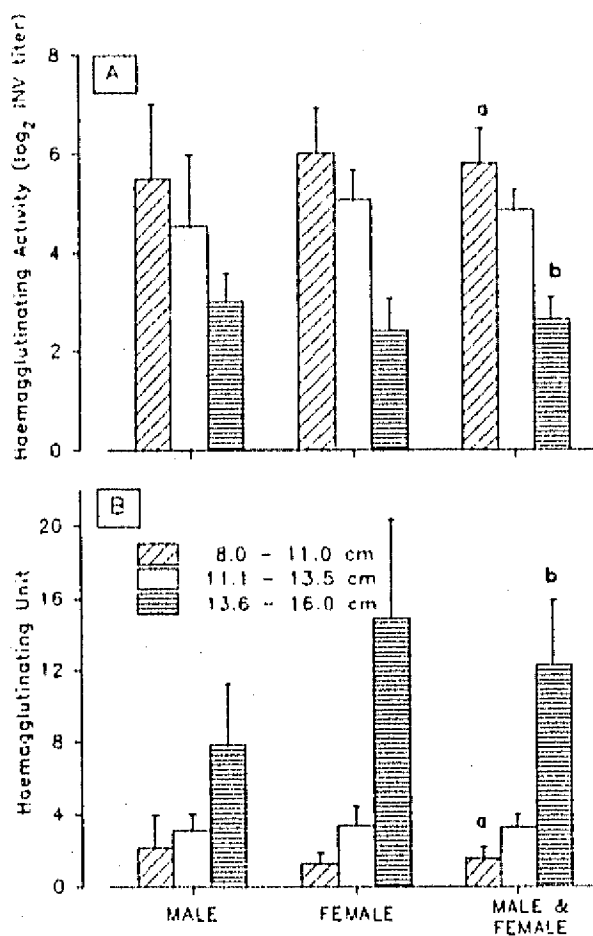


Figure 2. Size-dependence haemagglutinating activity in the haemolymph from blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). The animals were separated into three groups and the titer (A) or haemagglutinating unit (B) were analyzed by ANOVA 1W. Differences ($P < 0.05$) are indicated by letter on E.S. bar.

(Figure 2), but no differences were observed in protein content. This was also observed when male and female shrimp were analyzed separately.

A relationship between protein content and haemagglutinating activity was established. The haemagglutinating unit (HU) could be defined as the minimal protein quantity capable of causing agglutination (protein concentration/titer). Using this quotient, the significant difference was maintained (Figure 2b), indicating that haemagglutinating activity was independent of protein content.

DISCUSSION

Modifications in serum component levels have been observed in invertebrates under different physiological conditions. Example of these include, changes in protein composition of American cockroaches haemolymph by immunization with proteins (George, *et al.*, 1987) and increases in both ecdysteroids and total protein of haemolymph from *Penaeus vannamei* during proecdysis (Chan *et al.*, 1988). Another good example was the observed decrease in both protein and sugar content of molluscan haemolymph during infection (Cheng *et al.*, 1978, 1983; Muley and Fen, 1981). Some authors support the idea that this phenomenon is produced when parasites consume the serum protein and carbohydrate (Becker and Hirtbath, 1975; Muley and Fen, 1981). However, environmental factors such as temperature and salinity may also influence haemolymph protein and carbohydrate concentration in mollusca (Fisher and Newell, 1986) and in crustacea (Spicer and Taylor, 1987). Thus, it is possible that a resulting reduction in protein and/or carbohydrate concentration can facilitate the establishment of infection.

Modifications in serum component levels of shrimp have also been observed under special physiological or environmental conditions. The diet of *Penaeus vannamei* (Cruz-Ricque *et al.*, 1989) and the molt

stage in *Penaeus japonicus* (Chan *et al.*, 1988) can alter the protein and/or sugar serum levels. In *P. stylirostris*, the influence of animal size on serum osmolality has been observed (Vargas-Albores and Ochoa, 1992). However, in this work, modifications in the total serum protein content was not detected in *P. stylirostris*, indicating that this parameter is unaffected by animal size.

Osmotic pressure in shrimp is maintained by proteins, amino acids and ions in the haemolymph. In the blue shrimp, the ionic components have a good correlation with haemolymph osmolality (Vargas-Albores and Ochoa, 1992) and according to the results shown here, the participation of protein in this phenomenon is apparently low. Like other penaeid species (Castille and Lawrence, 1981a), the blue shrimp is a better osmoregulator during larval stages than when adult. However, they migrate from estuarine to ocean waters where the salinity is higher than isosmotic point. This migration is motivated more by reproductive than by nutritional or osmotic factors (Castille and Lawrence, 1981b). Thus, while the haemolymph ionic component is modified according to animal size and osmotic capacity, alterations in the protein content appear to be independent of these factors.

Similar to agglutinin from other crustaceans (Vasta and Marchalonis 1983), blue shrimp agglutinin is able to agglutinate human and other vertebrate erythrocytes, but lacks serological specificity against human blood types A,B, and O (Table 1). Since lectins are commonly found in body fluids, and by binding with defined carbohydrate, are able to specifically agglutinate bacteria (Bayne, 1980), viruses (McCumber *et al.*, 1979) and protozoa (Pereira *et al.*, 1981) they were initially considered to function as part of a defense system (Ratcliffe, 1985; Renwartz, 1986; Olafsen, 1988). Some invertebrate lectins have been shown to function as opsonins (Coombe *et al.*, 1984; Renwartz and Mohr, 1978; Rögner and Uhlenbruck, 1984; Renwartz, 1986) and this led some

researchers to consider lectin-binding as a first step in the recognition of foreign material (Rögner and Uhlenbruck, 1984; Vasta and Marchalonis, 1983; Ratcliffe, 1985; Renwartz, 1983, 1986; Sminia and van der Knaap, 1987; Olafsen, 1988).

When animal size was correlated to haemagglutinating activity, an important difference was observed. The mean haemagglutinating activity for the whole population studied was 4.48, yet animals measuring less than 11 cm showed haemagglutinating activity values above the mean (Figure 1). In contrast, animals 15 cm or larger showed little haemagglutinating activity. Thus it is possible to establish that shrimp size has a direct influence on haemagglutinating activity: from smaller shrimp (less than 11 cm) having elevated activity (1:32 to 1:256), to large shrimp (above 14.5 cm) having a lower activity (1:2 to 1:16). Since size is an indirect parameter of age or maturation, it follows that our results agree with other studies which correlated haemagglutinating activity with age in the erisilkworm (Bellah *et al.*, 1988) and with ovarian development in the acorn barnacle (Muramoto *et al.*, 1991). In the erisilkworm (*Philosamia ricini*), the haemagglutinating titers of the haemolymph were independent of sex (Bellah *et al.*, 1988), similar to blue shrimp where sex differences were not observed (Table 2). In the acorn barnacle (*Megabalanus rosa*) ovarian maturation was associated with maximum haemagglutinin levels, and decreased lectin levels during the spawning season (Muramoto *et al.*, 1991).

In the absence of information on shrimp agglutinins, and their physiological role, it is difficult to explain their modification in blue shrimp. However, it might be explained by associating our observations with those of other invertebrates studies. Dikkeboom *et al.* (1984), studying the maturation of the immune system of the pond snail (*Lymnaea stagnalis*), found that juveniles had fewer circulating haemocytes than adults. In addition, the cells from juvenile snails showed both mitotic activity and characteristics of

less differentiated cells. From these results, they concluded that juvenile snails have a less developed cellular immune system than adults. This is consistent with a previous report on *Biomphalaria glabrata* (Stumpf and Gilbertson, 1978), where a low peroxidase activity is also manifested in the haemocytes from juvenile snails. This reduction in enzymatic activity and immaturity of the immune system is characterized by a higher susceptibility to the parasite *Schistosoma mansoni* (Granath and Yoshino, 1983).

In the blue shrimp, the highest frequency of viral and parasitic disease is found during the early stages of development (Lightner, 1983). If the maturation of the shrimp immune system is similar to mollusca, it is possible that an immature immune system at the cellular level is responsible for the susceptibility found in larval and juvenile blue shrimp. The humoral response is probably more active in the early stages and decreases as the cellular mechanisms (and animal) mature. This hypothesis may explain the decrease in agglutinin levels since these proteins are responsible for humoral responses in invertebrates.

Such immune system behavior is not exclusive to invertebrate animals. It is also characteristic of immune response development in higher animals where a maturation of the cellular response is followed by maturation of the organism and a replacement of the humoral response (Kay B., 1978; Stites and Cadwell, 1978). Therefore, in addition to a functional homology between vertebrate immunoglobulins and invertebrate agglutinins, a similarity in the maturation of both immune systems can be observed. The participation of the serum agglutinins, and the humoral response in early developmental stages, support the idea that, despite the diversity of immune response, the immune system of both invertebrate and vertebrate animals may have a similar development.

ACKNOWLEDGEMENT.

We would like to thank Fernando Vega and Victor Oseguera kindly helped with the shrimp collections and classification. We are grateful to Roy Bowers for grammatical review.

REFERENCES

- Bayne C. J. (1980) Molluscan immunity: Induction of elevated immunity in the land snail (*Helix*) by injection of bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*). *Develop. Comp. Immunol.* 4, 43-54.
- Becker W. and Hirtbach E. (1975) Effect of starvation on total protein and hemoglobin concentration in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51, 809-814.
- Bellah M. E. M., Ridi R. E., Abou-Elela R. and Cooper E. L. (1988) Age related occurrence of natural agglutinins in the crisilkworm, *Philosamia ricini*. *Develop. Comp. Immunol.* 12, 707-717.
- Castille F. L. Jr. and Lawrence A. L. (1981a) The effect of salinity on the osmotic, sodium and chloride concentrations in the hemolymph of euryhaline shrimp of the genus *Penaeus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A, 75-80.
- Castille F. L. Jr. and Lawrence A. L. (1981b) A comparison of the osmotic, sodium and chloride concentrations in urine and hemolymph of *Penaeus setiferus* (L.) and *Penaeus stylirostris* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol.* 70A, 525-528.
- Chan S. M., Rankin S. M. and Keeley L. L. (1988) Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biol. Bull.* 175, 185-192.
- Cheng T. C., Guida V. G. and Gerhart P. L. (1978) Aminopeptidase and lysozyme levels and serum protein concentrations in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. *J. Invertebr. Path.* 32, 297-302.
- Cheng T. C., Howland K. H., Moran H. J. and Sullivan J. T. (1983) Studies on parasitic castration: aminopeptidase activity levels and protein concentration in *Lymnaea obsoleta* (mollusca) parasitized by larval trematodes. *J. Invertebr. Path.* 42, 52-50.
- Coombe D. R., Ey L. and Jenkin C. R. (1984) Particles recognition by haemocytes from the ascidian *Botrylloides leachii*: evidence that *B. leachii* HA-2 agglutinin is opsonic. *J. Comp. Physiol.* 154B, 509-521.
- Couch L., Hertel L. A. and Loker E. S. (1990). Humoral response of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: Observations on a

- circulating hemagglutinin. *J. Exp. Zool.* **255**, 340-349.
- Cruz-Rique L. E., Guillaume J. and van Wormhoudt A. (1989). Effect of squid extracts of the time course appearance of glucose and free amino acids in haemolymph in *Penaeus japonicus* after feeding: preliminary results. *Aquaculture* **76**, 57-66.
- Dikkeboom R., van der Knaap W. P. W., Meuleman E. A. and Sminia T. (1984) Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res.* **238**, 43-47.
- Durliat M. and Vranckx R. (1981) Action of various anticoagulants on hemolymphs of lobsters and spiny lobsters. *Biol. Bull.* **160**, 55-68.
- Fisher W. S. and Newell R. I. E. (1986) Seasonal and environmental variation in protein and carbohydrate levels in the hemolymph from american oysters (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**, 365-372.
- George J. F., Karp R. D., Rellahan B. L. and Lessard J. L. (1987) Alteration of the protein composition in the haemolymph of american cockroaches immunized with soluble proteins. *Immunology* **62**, 505-509.
- Granath W. O. and Yoshino T. P. (1983) Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J. Exp. Zool.* **226**, 205-210.
- Hall J. L. and Rowlands D. T. Jr. (1974) Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry* **13**, 821-827.
- Kay M. M. B. (1978) Aging & the decline of immune responsiveness. In *Basic & Clinical Immunology* (Edited by Fudenberg H. H., Stites D. P., Caldwell J.L. and Wells J. V.), pp 322-333. Lange Med. Publ., Los Altos, Ca. USA.
- Komano H., Mizuno D. and Natori S. (1980) Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* **255**, 2919-2924.
- Komano H., Nozawa R., Mizuno D. and Natori S. (1983) Measurement of *Sarcophaga peregrina* lectin under various physiological conditions by radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* **258**, 2143-2147.
- Kubo T., Komano H., Okada M. and Natori S. (1984) Identification of hemagglutinating protein and bactericidal activity in the hemolymph of adult *Sarcophaga peregrina* on injury of body wall. *Develop. Comp. Immunol.* **8**, 282-291.
- Lightner D. V. (1983) Diseases of cultured penaeid shrimp. In *CRC Handbook of mariculture. Vol I. Crustacean aquaculture.* (Ed. McVey J. P.). CRC Press Inc. USA. pp: 289-320.
- Loker E. S. and Hertel L. A. (1987) Alterations in *Biomphalaria glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. *J. Parasitol.* **73**, 503-513.
- Lowry O. H., Rosebroug N. L., Farr A. L. and Randall R. J. (1951). Protein measurement with Folin fenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- McCumber L. J., Hoffmann E. M. and Clem L. W. (1979) Recognition of viruses and xenogeneic proteins by the blue crabs, *Callinectes sapidus*: a humoral receptor for T2 bacteriophage. *J. Invertebr. Pathol.* **33**, 1-9.
- Mulvey M. and Feng S. Y. (1981) Hemolymph constituents of normal and *Proctoeces maculatus* infected *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **70A**, 119-125.
- Muramoto K., Kado R., Takei Y. and Kamiya H. (1991) Seasonal changes in the multiple lectin compositions of the acorn barnacle *Megabalanus rosa* as related to ovarian development. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**, 603-607.
- Olafsen J. A. (1988) Role of lectin in invertebrate humoral defense. *Am. Fish. Soc. Special Publ.* **18**, 189-205.
- Pereira M. E. A., Andrade A. F. B. and Ribero J. M. C. (1981) Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. *Science* **211**, 597-600.
- Ratcliffe N. A. (1985) Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. *Immunol. Lett.* **10**, 253-270.
- Ravindranath M. H., Higa H. H., Cooper E. L. and Paulson J. C. (1985) Purification and characterization of an O-acetylsialic acid- specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* **260**, 8850-8856.
- Renwrantz L. (1983) Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defense reactions: the immunobiological importance of carbohydrate-specific binding molecules. *Develop. Comp. Immunol.* **7**, 603-608.
- Renwrantz L. (1986) Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **56**, 81-93.
- Renwrantz L. and Mohr W. (1978) Opsonising effects of serum and albumin gland extracts on the elimination of human erythrocytes from the circulation of *Helix pomatia*. *J. Invertebr. Pathol.* **31**, 164-170.
- Richards E. H. and Renwrantz L. R. (1991) Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca^{2+} -dependent, GalNAc-specific lectin and a Ca^{2+} -independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. *J. Comp. Physiol.* **161B**, 43-54.
- Rögner W. and Uhlenbruck G. (1984) Invertebrate lectins: the biological role of a biological rule. *Develop. Comp. Immunol.* **3**, 159-164.

- Sminia T. and van der Knaap W. P. W. (1987) Cells and molecules in molluscan immunology. *Develop. Comp. Immunol.* **11**, 17-28.
- Sokal R. R. and Rohlf F.J. (1981) *Biometry*. W.H. Freeman and Co. New York.
- Spicer J. J. and Taylor C. (1987) Ionic regulation and salinity related changes in haemolymph protein in the semi-terrestrial beachflea *Orchestia gammarellus* (Pallas) (Crustacea: amphipoda). *Comp. Biochem. Physiol.* **88A**, 243-246.
- Stites D. P. and Cadwell J. L. (1978) Phylogeny & ontogeny of the immune response. In *Basic & Clinical Immunology* (Edited by Fudenberg H. H., Stites D. P., Caldwell J.L. and Wells J. V.), pp 141-153. Lange Med. Publ., Los Altos, Ca. USA.
- Stumpf J. L. and Gilbertson D. E. (1978) Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: Factors affecting variability. *J. Invertebr. Pathol.* **32**, 177-181.
- Vargas-Albores F. and Ochoa J. L. (1992) Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentration in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. *Comp. Biochem. Physiol.* In press.
- Vasta G. R. and Marchalonis J. J. (1983) Humoral recognition factors in the Arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins. *Am. Zool.* **23**, 157-171.
- Vasta G. R., Cheng T. C. and Marchalonis J. J. (1984a) A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* **88**, 475-488.
- Vasta G. R., Marchalonis J. J. and Kohler H. (1984b) Invertebrate recognition protein cross-reacts with an immunoglobulin idiotype. *J. Exp. Med.* **159**, 1270-1276.
- Vasta G. R., Sullivan J. T., Cheng T. C., Marchalonis J. J. and Warr G. W. (1982) A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *J. Invertebr. Pathol.* **40**, 367-377.
- Vasta G. R., Warr G. W. and Marchalonis J. J. (1983) Serological characterization of humoral lectins from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Develop. Comp. Immunol.* **7**, 13-20.

**A LIPOPOLISACCARIDE-BINDING AGGLUTININ ISOLATED
FROM BROWN SHRIMP (*Penaeus californiensis* HOLMES)
HAEMOLYMPH.**

Francisco Vargas-Albores, M. Antonia Guzmán and José Luís Ochoa.

Center of Biological Research, Division of Experimental Biology, P.O. Box 128, La Paz, B.C.S., 23000, México.

RUNNING TITLE:

LPS-binding agglutinin from *Penaeus californiensis*.

ABSTRACT.

1. Haemolymph from the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) agglutinates erythrocytes of different vertebrate species.

2. A fraction containing haemagglutinating activity was isolated by affinity chromatography. The corresponding protein showed a molecular weight of 175 Kda, formed by four subunits.

3. The haemagglutinin is inhibited by GalNAc, NANA, fetuin and bacterial lipopolysaccharide.

4. Herewith we demonstrate the ability of this agglutinin to react with different *Vibrio* strains and the inhibitory capacity of LPS in this reaction.

INTRODUCTION.

Many humoral and cellular proteins with haemagglutinating activity have been isolated from various animals (Marchalonis and Edelman, 1968; Hammarström and Kabat, 1969; Baldo *et al.*, 1978; Komano *et al.*, 1980; Yeaton, 1981; Ashwell and Harford, 1982; Barondes, 1984; Umetsu *et al.*, 1984; Ravindranath *et al.*, 1985; Giga *et al.*, 1985; Qu *et al.*, 1987; Drickamer, 1988, Richards and Renwants, 1991). Most of these proteins are carbohydrate-binding proteins, and as such, can be defined as animal lectins. These proteins are usually detected by their ability to agglutinate untreated and enzyme treated vertebrate erythrocytes, yet so far, their biological role has not been determined.

As invertebrates do not synthesize specific antibodies (Lackie, 1980), and since a number of haemagglutinins have been isolated from their haemolymph and haemocytes, these proteins are presumed to participate in their defense against invading microorganisms or infections. Several haemagglutinins have been detected on the haemocyte surface (Amirante and Mazzalai, 1978; Vasta *et al.*, 1984; Cassels *et al.*, 1986; Parrinello and Arizza, 1989; Azumi *et al.*, 1991; Richards and Renwants, 1991) suggesting that they act as receptors which bind directly to the surface sugars of foreign particles.

The interaction of invertebrate agglutinins with bacteria has been poorly established. Renwranz (1986) indicated that although the precipitation of bacteria occurs under experimental conditions, it is difficult to explain how infection leads to sufficient bacterial density required for agglutination under natural conditions. Thus, it has been proposed that the most important role of invertebrate agglutinins in bacterial elimination is phagocytosis, more than agglutination or precipitation. Hence these proteins seem to have an important role in self/non-self recognition, independent of any elimination mechanism in which agglutinin participates.

Most invertebrate agglutinins have been detected and identified using the haemagglutination assay. However, this does not define the role of these proteins in the defense against bacteria. For example, many haemagglutinins show specificity against sialic acid, but this sugar is not present on bacterial surfaces. The reaction of such proteins with bacteria or bacterial surface components could provide more information about their physiological role.

In this paper, we report on the isolation of an agglutinin from brown shrimp (*P. californiensis*) cell-free haemolymph, which can bind bacterial lipopolysaccharide (LPS). In addition we describe its main molecular properties, its interaction with bacteria, and its inhibition with sugars, glycoproteins and bacterial LPS.

MATERIALS AND METHODS.

Haemolymph extraction.

Shrimp (*Penaeus californiensis*) of both sexes were collected from San Carlos Bay, B.C.S., México, and maintained in an aquarium (24 ± 4 °C, salinity 36 o/oo). Only the haemolymph from intermoult, apparently healthy shrimp was used. To avoid coagulation, 2-3 parts of anticoagulant solution (450 mM NaCl, 10

mM KCl, 10 mM EDTA.Na₂, 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm/Kg) were used. In this solution, the pH, osmolality, sodium and potassium concentrations were equivalent to shrimp haemolymph (Vargas-Albores and Ochoa, 1992). The haemolymph (50-200 μ l) was obtained as previously described (Vargas-Albores and Ochoa, 1992) from the pleopod base of the first abdominal segment. The pooled samples were centrifuged for 10 min (10°C) at 2000 g. The cell pellet was discarded, and the supernatant (plasma) was frozen until use.

Haemagglutinating assay.

The human and animal blood samples (except from mouse) were obtained by venous puncture, then collected and stored in sterile Alsever's solution. The mouse blood was obtained by cardiac puncture and stored the same way. Before using, the cells were washed twice by centrifugation (800 g, 10°C, 10 min) with saline solution (NaCl 0.15 M) and twice with TBS-Ca (TRIS buffered saline: 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.5, plus 10 mM CaCl₂). Finally, the red blood cells (RBC) were suspended to 2% (v/v) in TBS-Ca. The haemagglutination assays were performed on U-plates (Falcon). Two-fold serial dilutions of the shrimp serum were made in TBS-Ca; then, an equal volume (25 μ l) of a 2% suspension of erythrocytes was added. The plates were incubated at room temperature (26 ± 2 °C) for one hour. The control was the substitution of shrimp serum by TBS-Ca. The agglutination titer was recorded as the reciprocal of the last dilution, giving evidence of agglutination at one hour of incubation. The haemagglutinating unit is referred to as the minimum protein concentration (mg/ml) required for positive haemagglutination.

Preparation of asialofetuin.

A solution (10 mg/ml) of fetuin was hydrolyzed with 0.1 N H₂SO₄ in 0.15 M NaCl, at 80 °C for 1 hour, according to Spiro (1960). The asialofetuin was extensively dialyzed against TBS-Ca.

Isolation of the haemagglutinin.

The shrimp serum was dialyzed overnight against TBS containing 1 mM CaCl₂, and clarified by centrifugation at 40,000 g (20 min, 10°C). 8 ml of serum were applied to a column (5 ml) of N-acetyl-galactosamine-agarose (Pierce) previously stabilized with TBS + 1 mM CaCl₂. The column was washed with the same buffer until the optical density was zero. The retained material was eluted with TBS-EDTA (Tris buffered saline plus 5 mM EDTA.Na₂). One ml fractions were collected and analyzed by optical density at 280 nm, and by haemagglutinin activity against both human and mouse erythrocytes. The fractions with anti-human activity were pooled and concentrated by lyophilization and applied to a column (1 x 56 cm) of Sepharose 6B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden). The gel filtration was run at 5 ml/h and fractions of 0.5 ml were collected. The fractions were analyzed for haemagglutinating activity and pooled.

Molecular Weight determination.

The apparent molecular weight of the native protein was estimated by gel filtration performed at 18°C on a column (1 X 56 cm) of Sepharose 6B (Pharmacia Fine Chemicals, Sweden). Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was used to estimate the molecular weight of the native and denatured (Weber and Osborne, 1969) protein. Protein bands were developed with a silver stain kit (Sigma Chem. Co.):

Inhibition of the haemagglutination.

The haemagglutination inhibition assay was done as follows. 25 µl of inhibitor solution (in TBS-Ca) was incubated for 1 hour at room temperature with an equal volume of the agglutinin solution having an haemagglutination titer of 1:4. Then 50 µl of a 2% human erythrocyte were added. The inhibitory capacity was given in terms of the concentration needed to decrease the haemagglutination titer to zero. The following sugars were tested: D-glucose (Glc), D-galactose (Gal), D-mannose (Man), L-fucose (Fuc),

D-lactose (Lac), N-acetyl D-glucosamine (GlcNAc), N-acetyl D-galactosamine (GalNAc), and N-acetyl neuraminic acid (NANA). The glycoproteins tested were: fetuin, asialofetuin, bovine submaxillary mucin, porcine mucin, orosomucoid, and human transferrin. The inhibitory capacity of the lipopolysaccharide from *E. coli* (Sigma Chem. Co.) was also assayed.

Chemical Analysis.

The total protein content was measured according to Lowry *et al.*, (1951) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Effect of calcium.

The purified haemagglutinin was dialyzed overnight (at 4°C) against TBS-EDTA. Next, the sample was completely redialyzed against TBS (without Ca²⁺ nor EDTA). The remaining haemagglutinating activity was then determined in the presence or absence of 10 mM CaCl₂.

Bacteria.

Three bacterial strains were used in this experiment: *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 13456), *V. vulnificus* (ATCC 45671) and *V. fischeri* (ATCC 2987). In all experiments, the bacteria were grown in marine medium 2216 (Difco) for 18 h at 28°C, 120 rpm. To maintain homogeneity in the cultures, the inoculum was one tenth of the total culture volume of a bacterial suspension with optical density of 1, at 580 nm. The bacteria were washed three times by centrifugation (30,000 g, 10°C, 30 min) using MSS (Marine Salt Solution: NaCl 450 mM, HEPES 10 mM, pH 7.3). After this, the bacterial pellet was suspended in MSS containing 2.5% (v/v) of glutaraldehyde and incubated under agitation for 3 hours. The reaction was suspended by washing the bacteria with MSS, and the residual aldehyde was blocked by incubating overnight with glycine (1 M). No viable bacteria were observed after this treatment. Before using, the bacteria were washed with MSS and their concentration adjusted (1.0 A580 unit).

Erythrocytes	Titer	R.H.A.
Human A Type	1:16	1.00
Human B Type	1:16	1.00
Human O Type	1:16	1.00
Cow	1:2	0.25
Duck	1:2	0.25
Horse	0	0.00
Mouse	1:256	16.00
Rabbit	1:8	0.50
Rat	1:2	0.25

Table 1. Haemagglutinin activity of the Brown Shrimp hemolymph against human and other animals erythrocytes

Titer = Inverse of maximum dilution which gives positive agglutination;

RHA = Relative Haemagglutinating Activity (Human = 1.0)

Sedimentation of Bacteria.

The ability of the isolated agglutinin to interact with bacteria was tested by determining the rate of sedimentation. One ml cuvettes were filled with 850 μ l of MSS, 50 μ l of brown shrimp agglutinin and 100 μ l of glutaraldehyde-treated bacteria suspension. When inhibitors were used, 50 μ l of each were added 15 min before the bacteria were introduced. The results are expressed as the percentage of the difference in optical density, versus sedimentation time.

RESULTS.

Haemagglutinating activity of the plasma.

The cell-free plasma (obtained using anticoagulant solution) from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) showed important haemagglutinating activity against erythrocytes from several vertebrate species (table 1). As with other invertebrate agglutinins, the shrimp haemolymph showed different reactivity with the vertebrate erythrocytes tested, but was incapable of differentiating between human ABO types. The major reactivity of the haemolymph was against mouse erythrocytes (16 times more than human RBC), while no activity against horse RBC was detected. For the other vertebrate RBCs, haemagglutinating activity was less than for human RBCs.

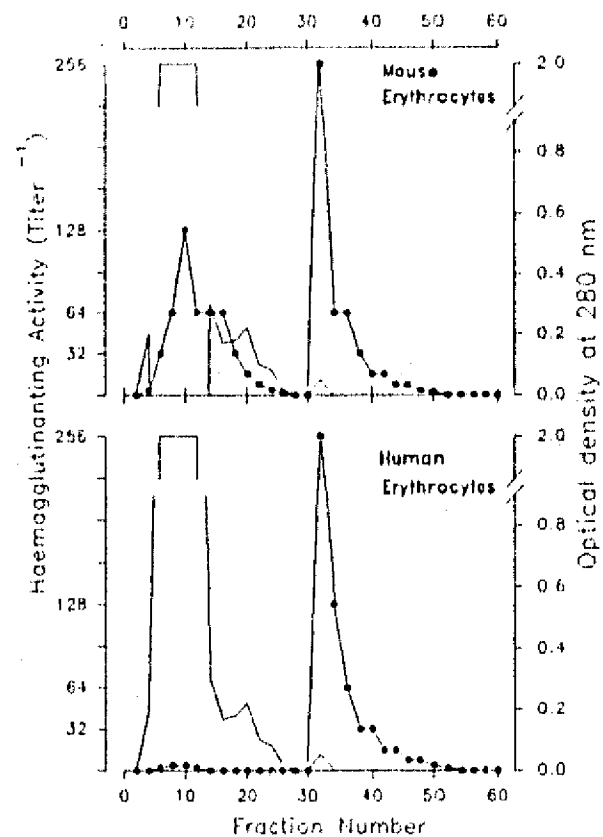


Figure 1. Affinity chromatography of brown shrimp (*P. californiensis*) haemolymph on GalNAc-agarose column (5 ml). The column was washed with TBS-Ca until the absorbance became negligible, then the eluting buffer was changed to TBS-EDTA at the point indicated by the arrow. For each fraction, absorbance at 280 nm and haemagglutinating activity was tested against both human and mouse erythrocytes.

Purification of the agglutinin.

Since the haemagglutinating activity of the brown shrimp haemolymph was inhibited partially by GalNAc and fetuin, a GalNAc-Agarose column was used for its purification. Two fractions with haemagglutinating activity were detected (Figure 1). The unretained fraction (Fraction A) contained the major part of haemolymph proteins and haemagglutinating activity against mouse, but not against human erythrocytes. The EDTA-eluted fraction (Fraction B) showed haemagglutinating activity against both human and mouse RBC. This last fraction, designated as BSH-I, was applied to a Sepharose 6B column (1 x 56 cm) to separate minor contaminants.

Fraction	Protein (mg/ml)	Volume (ml)	Mouse Erythrocytes			Human Erythrocytes		
			Titer	HAU	P.F.	Titer	HAU	P.F.
Haemolymph	42.75	8.0	1:2048	20.87	1.00	1:128	333.99	1.00
H. dialyzed	30.06	8.0	1:2048	14.67	1.42	1:128	234.80	1.42
Fraction A	18.33	13.5	1:512	35.80	0.58	1:4	4582.50	0.10
Fraction B	0.06	15.0	1:128	0.44	47.40	1:64	0.89	375.26
Sepharose	0.10	6.0	1:256	0.39	53.50	1:128	0.78	428.19

Table 2. Purification of the brown shrimp (*Penaeus californiensis*) agglutinin.

HAU = Haemagglutinating unit is defined as the amount of protein (micrograms) required to give one well of haemagglutination
P.F. = Purification factor.

The results are summarized in table 2, where the degree of purification is shown.

Molecular weight of Haemagglutinin.

The apparent molecular weight of the purified native brown shrimp haemagglutinin (BSH-I) was 180 Kda as estimated by gel filtration (Figure 2). A comparable result (170 Kda) was obtained by non-denaturing PAGE (not shown). In addition, the apparent molecular weight of the dissociated agglutinin, estimated by SDS-PAGE under non-reducing conditions, yielded a single protein band of about 85 Kda (Fig. 3), but under reducing conditions, the only band

observed showed an apparent molecular weight of 41 Kda. Thus, it is apparent that this agglutinin is built up by 4 subunits of similar molecular weight but linked in two different ways to one another.

Effect of Calcium.

The BSH-I was dialyzed against TBS-EDTA and TBS (EDTA and Ca^{2+} free). When a Ca^{2+} -free buffer was used for the haemagglutination assay, no haemagglutinating activity was shown. However when 10 mM $CaCl_2$ were added to the assay, the haemagglutinin regained its original activity.

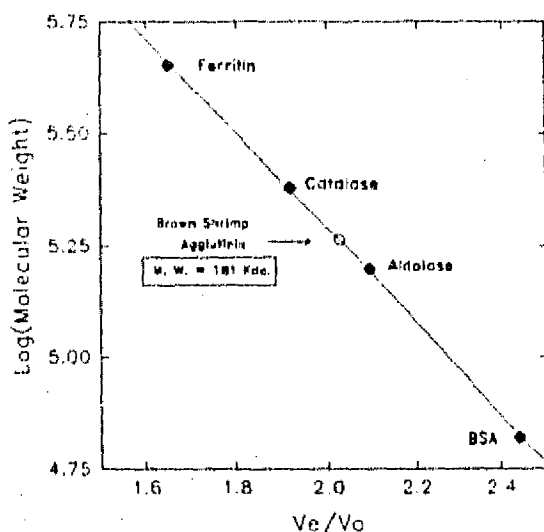


Figure 2. Molecular weight of the brown shrimp agglutinin was determined using a Sepharose column. Molecular marker (Pierce), samples and column were previously stabilized with TBS-Ca. The molecular markers were detected by absorbance at 280 nm, while the agglutinin was detected by haemagglutination.

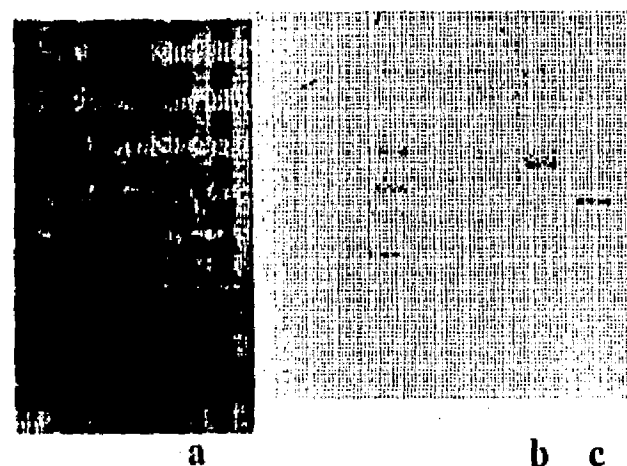


Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of brown shrimp agglutinin isolated by affinity chromatography and gel filtration under non-denaturing conditions (lane a); SDS nonreducing conditions (lane b) and SDS reducing conditions (lane c). The molecular markers are indicated.

Inhibition of haemagglutination.

The effect of various sugars, glycoproteins and bacterial LPS on the haemagglutinating activity of the BSH-I is shown in Table 3. GalNAc, GluNAc, NANA, fetuin, submaxillary bovi-ne mucin, and *E. coli* LPS were able to inhibit the agglutination of human erythrocytes. The reduced inhibitory effect of asialofetuin suggests that the sialic acid residues may contribute to the specificity of the BSH-I, although NANA had little inhibitory effect on haemagglutination. Thus, the binding site of the BSH-I appears complex.

Agglutination of Bacteria.

Since LPS is a component of the cell wall of Gram negative bacteria and this compound showed an interesting inhibitory effect, it is possible to assume that BSH-I would bind to Gram negative bacteria. This was demonstrated by an increase in the sedimentation rate of suspended bacteria in buffer solution. As shown in Figures 4 and 5, no difference was found

between the different *Vibrio* strains tested. As observed in Figure 5b, the addition of LPS to the *V. parahaemolyticus*/BSH-I assay, produced a bacteria sedimentation rate similar to that when agglutinin was not added. Similarly, but to a lesser extent, the GalNAc showed an inhibitory effect. These results are in agreement with those obtained by the inhibition of haemagglutination test.

DISCUSSION

The haemolymph of many invertebrates is known to agglutinate foreign erythrocytes. The lectins responsible for haemagglutination have been isolated and characterized from haemolymph and haemocytes. Their sugar specificity, molecular structure and ionic requirements differ widely, and the exact functions of the invertebrate agglutinins remain to be understood. There are apparent contradictions as to how agglutinins can participate in the elimination of foreign material. For example, haemolymph lectins from *Homonis americanus* (Hall and Rowlands, 1974), *Mytilus edulis* (Renwranz and Stahmer, 1983) and *Aplysia californica* (Pauley et al., 1971) act as opsonins which enhance phagocytosis against foreign particles. In several animals such as *Mytilus edulis* (Renwranz and Stahmer, 1983), *Crassostrea virginica* (Vasta et al., 1984), *Lymnaea stagnalis* (van der Knaap et al., 1981) and *Leucophaea maderae* (Amirante and Mazzalai, 1978), haemolymph agglutinins have been found in haemocyte membranes by using polyclonal antibodies as a probe. This association with haemocyte plasma supports the idea that they act as membrane-bound receptors which can recognize "foreignness". On the other hand, there is evidence which indicates that haemolymph itself is not opsonic (Scott, 1971; Fuke and Sugai, 1972; Rowley and Ratcliffe, 1980; Abul-Salam and Michelson, 1980), nor do haemocytes show immunoreactivity against haemolymph lectin (Stein and Basch, 1979; Suzuki and Mori, 1990). Hence, it seems that the definitive physiological function of invertebrate haemolymph lectins has yet to be determined.

Glycoproteins (mg/ml)	
Fetuin	0.62
Fetuin desialized	5.00
Porcine Mucin	n.i.
Bovine Submaxillary Mucin	1.25
Orosomucoid	5.00
Human Transferrin	5.00
Carbohydrates (mM)	
Fucose	n.i.
Galactose	n.i.
Glucose	n.i.
Mannose	n.i.
N-Acetyl galactosamine	25.0
N-Acetyl glucosamine	50.0
N-Acetyl neuraminic acid	50.0
Lipopolysaccharide (mg/ml)	0.012

Table 3. Effect of sugars, glycoproteins and bacterial LPS on the haemagglutinating activity of the brown shrimp agglutinin. The values are given as the minimal concentration required to inhibit four haemagglutinating units.

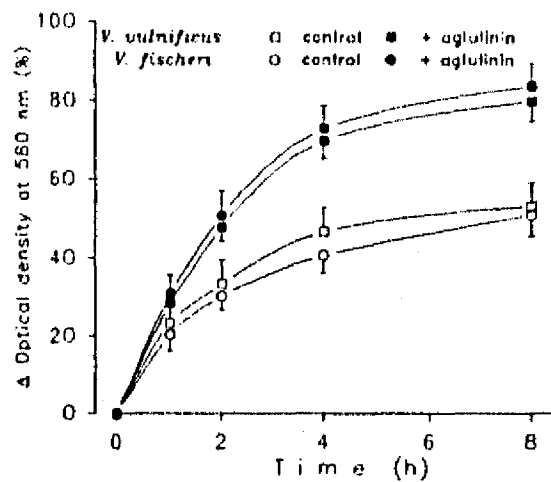


Figure 4. The rate of sedimentation of *Vibrio vulnificus* and *V. Fischeri* in the presence (filled) and absence (empty) of the BSH-I.

Because coagulation is a fast process in shrimp and other crustacea (Durliat and Vranckx, 1981), an anticoagulant solution is required to obtain a cell-free preparation. Although one anticoagulant solution has been used previously to obtain haemocytes from marine crustacea (Smith and Söderhäll, 1983), this solution was not useful for extracting the brown shrimp haemolymph due to protein precipitation was observed (data not shown). Based on an earlier study of sodium and potassium concentrations, pH and osmolality of shrimp haemolymph (Vargas-Albores and Ochoa, 1992), we designed an anticoagulant solution to easily obtain the brown shrimp haemolymph without protein precipitation or coagulation. The integrity of the cells was verified by microscopic observation to ensure that no cell contamination was present in our plasma preparation. Because the osmolality of the shrimp haemolymph is high, and because of the presence of EDTA in the anticoagulant, it was necessary to dialyze the shrimp plasma before using it in haemagglutination tests. During the dialysis, some proteinaceous material without haemagglutinating activity was precipitated.

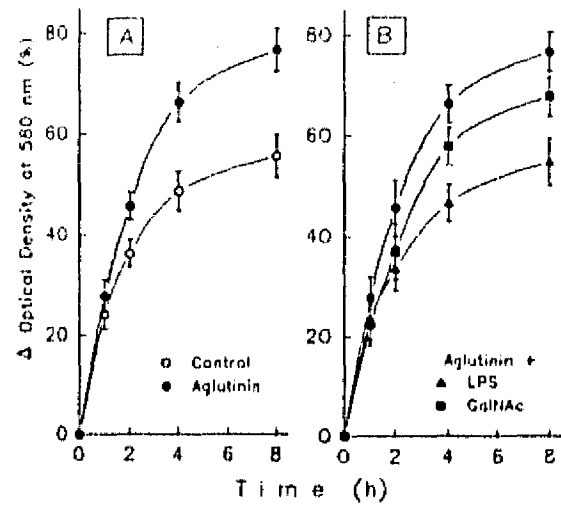


Figure 5. Interaction of the BSH-I and *Vibrio parahaemolyticus*. The BSH-I increase in the rate of sedimentation (A), could be inhibited by GalNAc and LPS (B).

Similar to other invertebrates, the brown shrimp haemolymph showed agglutinating activity against vertebrate RBCs. Instead of using haemoabsorption to detect different haemagglutinating activities, as done in other studies on invertebrate agglutinins we separated these different haemagglutinating activities by affinity chromatography. Our results showed that brown shrimp haemolymph has more than one haemagglutinating activities: the first against mouse RBCs, and the second against mouse and human RBCs (Table 2 and Figure 1). For the latter, a gel filtration step was necessary to obtain a single protein band (BSH-I) in PAGE. Multiple serum agglutinins have been noted for other crustaceans such as: *Callinectes sapidus* (Cassels et al., 1986), *Homarus americanus* (Hall and Rowlands, 1974a, b), *Macrobrachium rosenbergii* (Vasta et al., 1983) and *Birgus latro* (Vasta and Cohen, 1984).

Because of their variability, the molecular weight of invertebrate agglutinins and the number and size of their subunits is not useful for comparative or phylo-

genetic studies. In general, the only characteristic that is common to all invertebrate agglutinins is their ability to interact with saccharide residues. Thus, many differences in molecular structure can be observed between related species. For example, in the genus *Penaeus*, the BSH-I is a tetrameric protein with a molecular weight of 175 ± 5 Kda; *P. monodon* lectin is a 420 Kda protein, built up by subunits of 27 Kda (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990), while the *P. stylirostris* agglutinin has an apparent molecular weight of 30 Kda (Vargas-Albores, unpublished data). On the other hand, the calcium dependence for agglutination activity displayed by BSH- I seems to be a common feature for agglutinins from *P. monodon* (Ratanapo and Chulavatnatol, 1990), and *P. stylirostris* (Vargas-Albores *et al.*, 1992), as well as, from other crustaceans such as the lobster, *Homarus americanus* (Hall and Rowlands, 1974a), the crab *Cancer antennarius* (Ravindranath *et al.*, 1985), and the blue crab, *Callinectes sapidus* (Cassels *et al.*, 1986).

The specificity of the agglutinins from arthropods is diverse, although sialic acid-specific lectins have been found among several species such as *Homarus americanus* (Hall and Rowlands, 1974a), *Macrobrachium rosenbergii* (Vasta *et al.*, 1983), *Birgus latro* (Vasta and Cohen, 1984), *Cancer antennarius* (Ravindranath, *et al.*, 1985) and *Penaeus monodon*. However, *H. americanus* also has a GalNAc-specific agglutinin (Hall and Rowlands, 1974a), and both *M. rosenbergii* (Vasta, *et al.*, 1983) and *B. latro* (Vasta and Cohen, 1984) have a second agglutinin with undetermined specificity. Thus, the presence of multiple agglutinins is frequent in marine arthropods, and one of these agglutinins is apparently sialic acid-specific.

At least two agglutinins were also detected in brown shrimp haemolymph. The BSH-I showed a partial specificity for GalNAc and NANA. Additionally, the BSH-I bound glycoproteins, sugars and bacterial LPS (Table 3), indicating a considerable variation in specificity. The BSH-I binding ability against LPS

(Table 3) suggests that BSH-I is capable of binding to Gram negative bacteria. This was confirmed by our bacteria sedimentation experiments (Figure 2 and 3). The fact that the brown shrimp agglutinin can bind and agglutinate marine bacteria (including pathogens) is significant to the physiological role of haemagglutinin.

LPS-binding proteins which are involved in defense mechanisms have been reported in other animals. An LPS-binding glycoprotein (60 Kda) could be detected in rabbit plasma during the acute-phase of inflammation (Tobias *et al.*, 1986). This protein was able to bind to the surface of *Salmonella* or to LPS-coated erythrocytes, enhancing their attachment to macrophages (Wright *et al.*, 1989). Two LPS-binding proteins have also been isolated from the haemocytes of the horseshoe crab. One protein (11.6 Kda) is called anti-LPS factor (Aketagawa, *et al.*, 1986), while the other, a zymogen of serine protease, is called factor C (Nakamura, *et al.*, 1988). In another study, a haemagglutinin which was able to bind to LPS was detected in the haemocyte, but not in the plasma, of *Halocythia roretzi* (Azumi, *et al.*, 1991).

In summary, the BSH-I is a calcium dependent protein with a molecular weight of 175 ± 5 Kda which can be inhibited by sugars (GalNAc, NANA), glycoproteins (fetuin) and bacterial LPS. Furthermore, BSH-I is able to react with bacteria, which could help to explain the physiological role of this particular invertebrate serum agglutinin.

ACKNOWLEDGEMENT.

We are grateful to Dr. E. Zenteno and Dr. P. Pérez-Gavilán for valuable comments and Roy Bowers for grammatical review.

REFERENCE

- Abdul-Salam J. A. and Michelson E. H. (1980) Phagocytosis by amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*: absence of opsonic factor. *Malacol. Rev* 13, 81-83.

- Aketagawa J., Miyata T., Ohtsubo S., Nakamura T., Morita T., Hayashida H., Miyata T., Iwanaga S., Takao T. and Shimonishi Y. (1986) Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *J. Biol. Chem.* **261**, 7357-7365.
- Amirante G. A. and Mazzalai F. G. (1978) Synthesis and localization of hemoagglutinins in hemocytes of the cockroach *Leucophaea maderae* L. *Dev. Comp. Immunol.* **2**, 735-740.
- Ashwell G. and Hardford J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 531-554.
- Azumi K., Ozeki S., Yokosawa H. and Ishii S.-I. (1991) A novel lipopolysaccharide-binding hemagglutinin isolated from hemocytes of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: it can agglutinate bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 9-16.
- Baldo B. A., Samyer W. H., Stick R. V. and Uhlenbruck G. (1978) Purification and characterization of a galactan-reactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima* (Roding) and a study of its combining site. *Biochem. J.* **175**, 467-477.
- Barondes S. H. (1984) Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science* **223**, 1259-1264.
- Cassels F. J., Marchalonis J. J. and Vasta G. R. (1986) Heterogeneous humoral and hemocyte associated lectins with N-acetylaminosugar specificities from the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**, 23-30.
- Drikamer K. (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* **263**, 9557-9560.
- Durliat M. and Vranckx R. (1981) Action of various anticoagulants on hemolymphs of lobsters and spiny lobsters. *Biol. Bull.* **160**, 55-68.
- Fuke M. T. and Sugai T. (1972) Studies on the naturally occurring hemagglutinin in the coelomic fluid of an ascidian. *Biol. Bull.* **143**, 140-149.
- Giga Y., Sutoh K. and Ikai A. (1985) A new multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. *Biochemistry* **24**, 4461-4467.
- Hall J. L. and Rowlands D. T. (1974a) Heterogeneity of lobster agglutinins. I. Purification and physicochemical characterization. *Biochemistry* **13**, 821-827.
- Hall J. L. and Rowlands D. T. (1974b) Heterogeneity of lobster agglutinins. II. Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. *Biochemistry* **13**, 828-832.
- Hammarström S. and Kabat E. A. (1969) Purification and characterization of a blood-group A reactive hemoagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its binding site. *Biochemistry* **8**, 2629-2705.
- Komano H., Mizuno D. and Natori S. (1980) Purification of lectin induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Biol. Chem.* **255**, 2919-2924.
- Lackie A. M. (1980) Invertebrate immunity. *Parasitology* **80**, 393-412.
- Lowry O. H., Rosebroug N. L., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Marchalonis J. J. and Edelman G. M. (1968) Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *J. Mol. Biol.* **32**, 453-465.
- Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T. and Shimonishi Y. (1988) Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). *J. Biol. Chem.* **263**, 16709-16713.
- Parrinello N. and Arizza V. (1989) Sugar specific cellular lectins of *Phallusia mamillata* hemocytes: Purification, characterization and evidence for cell surface localization. *Dev. Comp. Immunol.* **13**, 113-121.
- Pauley G. B., Granger G. A. and Krassner S. M. (1971) Characterization of a natural agglutinin present in the hemolymph of the California Sea hare, *Aplysia californica*. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 207-218.
- Qu X. M., Zhang C. F., Komano H. and Natori S. (1987) Purification of a lectin from the hemolymph of chinense oak silk moth (*Antheraea pernyi*) pupae. *J. Biochem.* **101**, 545-551.
- Ravindranath M. H., Higa H. H., Cooper E. L. and Paulson J. C. (1985) Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antenarius*. *J. Biol. Chem.* **260**, 8850-8856.
- Renwantz L. (1986) Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* **56**, 81-93.
- Renwantz L. and Stahmer A. (1983) Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.* **149**, 535-546.
- Richards E. H. and Renwantz L. R. (1991) Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca^{2+} -dependent, GalNAc-specific lectin and a Ca^{2+} -independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognises activated homologous opsonins. *J. Comp. Physiol.* **161 B**, 43-54.
- Rowley A. F. and Ratcliffe N. A. (1980) Insect erythrocyte agglutinins: *In vitro* opsonization experiments with *Chlummus extradentatus* and *Periplaneta americana* haemocytes. *Immunology* **40**, 483-492.
- Scott M. T. (1971) Recognition of foreignness in invertebrates. II. *In vitro* studies of cockroach phagocytic haemocytes. *Immunology* **21**, 817-828.
- Stein E. A., Morovati A., Rahimian P. and Cooper E. L. (1989) Lipid agglutinins from coelomic fluid of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* **94B**, 703-707.

- Stein P. C. and Basch P. F. (1979) Purification and binding properties of hemagglutinin from *Biomphalaria glabrata*. *J. Invertebr. Pathol.* 33, 10-18.
- Tobias P. S., Soldau K. and Ulevitch R. J. (1986) Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J. Exp. Med.* 164, 777-793.
- Umetsu K., Kosaka S. and Suzuki T. (1984) Purification and characterization of a lectin from the beetle, *Allomyrina dichotoma*. *J. Biochem.* 95, 239-245.
- van der Knaap W. P. W., Boerrigter-Barendsen L. H., van der Hoeven D. S. P. and Smitia T. (1981) Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res.* 219, 291-296.
- Vargas-Albores F. and Ochoa J.-L. (1992) Variations of pH, osmolality, sodium and potassium concentrations in the haemolymph of sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) according to size. *Comp. Biochem. Physiol.* In press.
- Vargas-Albores F., Guzmán M. and Ochoa J.-L. Size-dependence haemagglutinating activity in the haemolymph from sub-adult blue shrimp (*Penaeus stylirostris* Stimpson). *Comp. Biochem. Physiol.* In press.
- Vasta G. R., Cheng T. C. and Marchalonis J. J. (1984) A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* 88, 475-488.
- Vasta G. R. and Cohen E. (1984) Carbohydrate specificities of *Birgus latro* (coconut crab) serum lectins. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 197-202.
- Vasta G. R., Warr G. W. and Marchalonis J. J. (1983) Serological characterization of humoral lectins from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 13-20.
- Weber R. K. and Osborne B. T. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.
- Wright S. D., Tobias P. S., Ulevitch R. J. and Ramos R. A. (1989) Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophage. *J. Exp. Med.* 170, 1231-1241.
- Yeaton R. W. (1981) Invertebrate lectins. I. Occurrence. *Dev. Comp. Immunol.* 5, 391-402.