

00377
15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Caracterización de la lectina específica para
ácido siálico del langostino *Macrobrachium*
rosenbergii por métodos inmunoenzimáticos.

292176

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A:

BIOL. MOHAMED ALI PEREYRA MORALES

CIUDA UNIVERSITARIA, MEXICO.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio nueve del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina. Bajo la dirección de la QFB Concepción Agundis Mata y el M. en C. Roberto Zenteno Cuevas. Durante el desarrollo de esta tesis, el sustentante fue becario de la DGEP, UNAM y del CONACYT.

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR:

CONACYT No. 27609-M y 26068-N.

DGAPA PAPIIT-UNAM No. IN224598.

PROGRAMA ECOS, México-Francia No. M97B05.

IMSS, Coordinación de Investigación Clínica.

UNAM, Dirección General de Estudios de Posgrado.

Con mucho cariño a mis padres:

Teodora y

Edmundo

Por su afecto, comprensión
y paciencia

A mis hermanos:

Marbella y

Edmundo

por lo que llevamos
y lo que falta

A Eugenia:

por tu paciencia, comprensión, amor,
por ser una gran pareja.

A Ali Adair

Agradecimientos

A los Dres. Luisa Alba Lois, Ricardo Lascurain Ledesma, Luis Felipe Montañó Estrada y Lorena Vazquez Navarrete por sus críticas y sugerencias para mejorar esta tesis.

Al Dr. Edgar Zenteno por la confianza depositada en mi para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Salvador Martínez-Cairo del Centro Medico Nacional "Siglo XXI" IMSS por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A Concepción Agundis Mata, porque me enseñó a valorar el trabajo rutinario y el fascinante mundo de los híbridomas, por las críticas, comentarios, enseñanzas, paciencia, amistad, consejos, etc., gracias.

A Roberto Zenteno Cuevas, por el apoyo brindado durante la realización de éste trabajo y por las enseñanzas recibidas durante todo éste tiempo.

A todos los integrantes del Laboratorio 9 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina por su amistad y los consejos recibidos durante este tiempo.

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Algunas lectinas caracterizadas de artrópodos.....	13
Figura 1. Estructura de Neu5Ac.....	18
Tabla 2. Esquema de inmunización de los ratones de fusión.....	25
Figura 2. Patrón de elución de lectina MrL de hemolinfa de organismos adultos.....	36
Tabla 3. Proceso de purificación de la lectina de <i>M. rosenbergii</i> , en estroma de eritrocitos de rata (a partir de 1 ml de hemolinfa).....	36
Figura 3. ELISA de ratones de fusión.....	37
Figura 4: Esquema de clonación de los híbridos obtenidos.....	38
Tabla 4. Isotipo de clonas provenientes de BE3D6G1.....	38
Figura 5. ELISA a partir de híbridos BE3D6G1, contra MrL.....	39
Figura 6. Patrón de elución de Mab 1F9 en columna de DEAE-Sephadex.....	40
Figura 7. Electroforesis del Mab 1F9, purificada en DEAE-Sephadex.....	41
Figura 8. Patrón de elución de Mab 1F9 en columna Mono Q.....	41
Figura 9. Patrón de elución de la segunda fracción en columna Mono Q.....	42
Figura 10. SDS-PAGE del Mab 1F9, purificada en columna Mono Q en FPLC.....	42
Figura 11. Inmunolectrotransferencia de la lectina.....	43
Tabla 5. Composición de aminoácidos de la lectina purificada de <i>M. rosenbergii</i>	44
Tabla 6. Composición de carbohidratos de la lectina purificada de <i>M. rosenbergii</i>	44
Figura 12. Curva estándar de la lectina MrL en ELISA.....	45
Tabla 7. Determinación de la concentración de lectina por ELISA, en la hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> en diferentes estadios de maduración.....	46

INDICE

Resumen.....	7
Introducción.....	9
Mecanismos de defensa en invertebrados.....	9
Lectinas.....	12
Ácido siálico.....	18
Justificación.....	20
Hipótesis.....	22
Objetivos.....	23
Materiales y métodos.....	24
Organismos.....	24
Purificación de lectina.....	24
Anticuerpos monoclonales.....	25
Inmunización.....	25
ELISA.....	25
Obtención de macrófagos peritoneales.....	26
Obtención de la suspensión de células de bazo.....	26
Preparación de las células de mieloma.....	27
Fusión celular.....	27
Clonación de híbridos.....	28
Criopreservación de células.....	28
Caracterización de anticuerpos monoclonales.....	28
Producción de líquido de ascitis.....	29
Purificación de anticuerpos.....	29
Precipitación con sulfato de amonio.....	29
Purificación en DEAE-Sephadex.....	30
Purificación en Mono Q.....	30
Caracterización química de la lectina.....	30

Procedimientos analíticos.....	30
Determinación del peso molecular de la lectina.....	31
Inmunoelctrotransferencia.....	31
Determinación del contenido de lectina en diferentes estadios del langostino <i>M. rosenbergii</i>	32
Actividad hemaglutinante.....	34
Resultados.....	35
Langostinos.....	35
Purificación de lectina.....	35
Anticuerpos monoclonales.....	35
Purificación de anticuerpos.....	38
Purificación de anticuerpos monoclonales 1F9 en DEAE-Sephadex.....	39
Purificación de anticuerpos monoclonales 1F9 en Mono Q.....	40
Caracterización y composición química de la lectina.....	43
Determinación del peso molecular.....	43
Determinación del contenido de lectina en diferentes estadios del langostino <i>M. Rosenbergii</i>	44
Actividad hemaglutinante.....	45
Discusión.....	48
Conclusiones.....	55
Bibliografía.....	56

Tabla 8. Actividad hemaglutinante de la hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> obtenida en diferentes estadios de maduración.....	47
Tabla 9. Concentraciones mínimas (μM) de azúcares y glicoproteínas capaces de inhibir la actividad hemaglutinante de hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> obtenida en diferentes estadios de maduración..	47

ABREVIATURAS

DEAE-Sephadex	Dietilaminoetil Sephadex
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
D.O.	Densidad óptica
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución
GalNAc	N-Acetil-D-galactosamina
GlcNAc	N-Acetil-D-glucosamina
kDa	Kilo Daltons
Mab	Anticuerpo monoclonal
MrL	Lectina de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
β -MSH	β -Mercaptoetanol
Neu5Ac	Acido N-Acetil neuramínico
NK	Células asesinas naturales
OPD	Orto fenil diamina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	PBS-Tween
PEG	Polietilenglicol
ProPO	Profenoloxidasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poli(acrilamida con SDS
SFB	Suero fetal bovino
SSI	Solución salina isotónica
TBS	Amortiguador salino de tris
TEA	Trietanolamina
UHA	Unidades hemaglutinantes

RESUMEN:

El langostino *Macrobrachium rosenbergii*, se explota ampliamente en México en cultivos semintensivos como alternativa económica y fuente alimenticia. De la hemolinfa del langostino, se purificó una lectina por cromatografía de afinidad, en una columna conteniendo estroma de rata con Sephadex G-25 super fino como soporte. La lectina del langostino es una glicoproteína de 19 kDa, en su composición de aminoácidos hay glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico en mayor proporción, mientras que metionina e histidina se encuentran en menor cantidad; su contenido de azúcares es de 11%, entre ellos ácido NeuAc, galactosa, manosa y GlcNAc. Se obtuvieron anticuerpos monoclonales (MAb) contra la lectina de los cuales se caracterizó uno, denominado 1F9, con isotipo IgG3 κ . Del líquido de ascitis obtenido, se purificó el anticuerpo, por precipitación salina e intercambio iónico en una columna Mono Q, en el sistema FPLC.

Utilizando el MAb 1F9 se estandarizó un método de ELISA para cuantificar la lectina en la hemolinfa en los diferentes estadios de maduración, con este método se lograron detectar concentraciones de lectina de 30 ng/ml (1.5 fmol). En la etapa Juvenil I se presentó la mayor concentración de lectina con 2.6 ± 0.3 mg/ml, la etapa Juvenil II 1.8 ± 0.3 mg/ml, lo que representa el 1.5% y 0.7%, respectivamente, de proteína total presente en la hemolinfa. Los organismos Adulto I y Adulto II con 1.9 ± 0.4 mg/ml y 1.5 ± 0.7 mg/ml respectivamente, que representan el 0.7% y 0.5% de las proteínas séricas.

La actividad hemaglutinante de la hemolinfa en los diferentes estadios, se detectó únicamente con eritrocitos de rata, conejo y pollo. La mayor actividad se observó en organismos adultos (Adulto I). La lectina tiene especificidad por azúcares N-acetilados (mejores inhibidores de la actividad hemaglutinante) y glicoproteínas como fetuina, IgA, mucina submaxilar bovina y ovina, también mostraron capacidad inhibitoria.

La lectina podría funcionar como opsonina en el sistema inmune del crustáceo y en la regulación endocrina en el transporte de azúcares, debido al

INTRODUCCION

Mecanismos de defensa en invertebrados

Los estudios sobre la inmunidad en invertebrados (moluscos, insectos y crustáceos) han sido enfocados a identificar los eventos celulares (Burnet, 1974; Bautista, 1988; Brock, 1993) y la naturaleza molecular de factores séricos (Parish, 1977) que participan en la eliminación de los microorganismos patógenos. Dentro de los mecanismos de defensa, los más importantes que se han identificado son la desgranulación, que da lugar a la liberación y activación de sistemas multienzimáticos, el de la enzima proPO (Soderhall, 1982) o la actividad fagocítica (Soderhall *et al.* 1986); la formación de nódulos (Bayne, 1990), la encapsulación (Soderhall *et al.* 1984; Persson *et al.* 1987) y la síntesis de factores séricos (Boucias *et al.* 1994; Coombe *et al.* 1984).

El sistema de defensa de los artrópodos contra microorganismos oportunistas e invasores se efectúa principalmente a través de los hemocitos en circulación y de aquellos que se encuentran asociados a algún tejido. Los hemocitos poseen actividad fagocítica, pero algunos factores séricos influyen, aparentemente en esta actividad (Hose *et al.* 1990). Este proceso lo observamos en el sistema de la proPO; estas enzimas son activadas por diversos componentes de la pared de levaduras y bacterias, específicamente en la respuesta celular. Hasta el momento, se desconocen los mecanismos que regulan la producción y la función de los hemocitos, pero es evidente que tales procesos requieren señales de comunicación intra e intercelular que los regulen, en lo cual es posible que participen los grupos celulares encargados de reconocer y eliminar a los organismos patógenos que atacan a los invertebrados (Hose *et al.* 1990). Los hemocitos han sido clasificados, de acuerdo a sus características morfológicas y funcionales, clasificaciones no aplicables a todas las especies de crustáceos, por lo que existe una controversia para interpretar los diversos procesos celulares y bioquímicos que intervienen en los mecanismos inmunológicos.

Dentro del grupo de moléculas séricas que participan en los mecanismos de defensa de los invertebrados, se ha demostrado que las lectinas poseen gran relevancia a nivel evolutivo, ya que es posible encontrarlas en prácticamente todos los niveles de la escala evolutiva, participan en el reconocimiento de lo no propio, particularmente en el grupo de los crustáceos (Renwranz, 1986; Vasta, 1992). Las lectinas han sido consideradas como un mecanismo primario de reconocimiento de células propias, en especies primitivas del reino animal, tales como las esponjas (Du Pasquier, 1989; Van de Vyver *et al.* 1990).

La capacidad de las lectinas por aglutinar, ha permitido sugerir que su función favorecería la actividad fagocítica, al actuar como opsonina (Vasta, 1992) y modular de esta forma la estimulación de las reacciones séricas y celulares en crustáceos. Se ha sugerido que también pudieran participar en algunos procesos de regulación endocrina. Otros investigadores (Duwel-Eby & Karp, 1990) han propuesto que estas moléculas pudiesen tener una evolución convergente con las inmunoglobulinas (Ig), consideradas como mecanismo de defensa específico para vertebrados, aunque también se ha demostrado que los vertebrados poseen lectinas. La pista de la evolución de las Ig desaparece a nivel del ciclóstoma, el vertebrado más primitivo, lo que nos permite suponer que en la evolución de los anticuerpos (Ac), éstos son mediadores de las estrategias de defensa para los organismos que generalmente tienen poca progenie, con una vida relativamente larga, y son parte de poblaciones escasas. Tales especies podrían tener poca probabilidad de generar variantes genéticas que podrían favorecer la adaptación (Hilgard *et al.* 1974). Esto propone que los vertebrados desarrollan una nueva estrategia en la cual la selección ha cambiado desde los niveles celulares a los niveles de población. Por otra parte, se tiene idea que los invertebrados son básicamente de existencia corta, que son capaces de reproducirse, aún en condiciones ambientales adversas y esto no necesariamente por un mecanismo de defensa sofisticado. Los invertebrados han estado bajo presiones selectivas teniendo que sobrevivir hasta la maduración sexual para lograr sucesos reproductivos.

Recientemente, se ha sugerido que la respuesta inmune específica y de memoria está restringida a las especies de vertebrados. Se considera que la mayoría de los mecanismos de defensa de los invertebrados es una forma de discriminación, que está limitada a las respuestas primitivas de fagocitosis y encapsulación, por lo que suponemos que los invertebrados podrían reconocer sus constituyentes, pero que solo los vertebrados reconocen organismos extraños de una manera específica (Hildemann *et al.* 1981), no obstante, este dato indica que algunos invertebrados muestran una inmunocompetencia que les permite preservar su integridad (Hilgard *et al.* 1974). Diversos estudios han demostrado la presencia de aglutininas con capacidad para reconocer eritrocitos de vertebrados y proteínas exógenas, así como de opsoninas inducibles en moluscos, sipuncúlidos, anélidos, crustáceos, arácnidos, equinodermos, tunicados e insectos. La mayoría de los estudios concernientes a los sistemas de defensa de los insectos, confirman que la naturaleza de la inmunidad humoral es también inducible, como en los vertebrados (Boman *et al.* 1974). Dentro los factores inducibles se ha reportado una familia de proteínas antibacterianas de bajo peso molecular, como la cercropina, identificadas en la larva de la polilla cercropia; otras proteínas bacterianas han sido encontradas en varias especies de insectos (Hildemann *et al.* 1981; Boman & Hultmark, 1987). Estas proteínas proveen en términos cortos protección no específica, pero aparentemente no guardan homología con moléculas como las inmunoglobulinas, ni actúan en forma similar (Hildemann *et al.* 1981). Las proteínas antibacterianas son muy eficientes como protección de un organismo a infecciones, sin embargo, en insectos, ellas pueden representar el único mecanismo de defensa natural del organismo contra la flora intestinal durante eventos metamórficos (Boman, 1982).

Aunque muchos de los factores humorales en invertebrados aparentemente no son específicos, se han observado mediante experimentos de competencia, diferentes grados de especificidad. Así mismo, la actividad protectora puede ser transferida pasivamente por la hemolinfa del donador inmune. Desafortunadamente, ninguna de estas respuestas han demostrado memoria ante un reto secundario del antígeno. Trabajos sobre el potencial inmunológico de la

cucaracha *Periplaneta americana*, evidencian la verdadera existencia de la respuesta inmune humoral adaptativa en un sistema invertebrado (Hilgard *et al.* 1974). Las lectinas en los invertebrados se han encontrado asociadas a membranas celulares o solubles en la hemolinfa (Vasta *et al.* 1984). En los crustáceos, las lectinas reconocen estructuras complejas de carbohidratos, generalmente hacia los que contienen ácido siálico (Tabla 1). Otros estudios han demostrado que la presencia de la lectina incrementa la actividad fagocítica, ya que estas pueden funcionar como moléculas de adhesión, desencadenando la actividad fagocítica u otro evento celular como es la formación de nódulos y la encapsulación (Amirante, 1992). Por esto se considera a estas moléculas como un factor que modula la respuesta de la actividad inmune en los invertebrados.

Lectinas

Las lectinas son proteínas que abundan en la naturaleza, estas proteínas tienen como característica reconocer carbohidratos, son proteínas de origen no inmune, sin actividad enzimática. Por lo regular tienen capacidad mitógena, poseen dos o más dominios de unión a carbohidratos, por lo que cuando reconocen células, por ejemplo eritrocitos, podrían reaccionar con más de una célula, y si se forma una cantidad considerable de reacciones cruzadas, las células se aglutinan, de la misma manera pueden formar reacciones cruzadas con glicoproteínas o polisacáridos solubles, e inducir precipitación, la reacción de aglutinación es la que se usa de manera general para su detección. La interacción de la lectina con el carbohidrato es de tipo no covalente (Hernández *et al.* 1998; Vázquez *et al.* 1998).

Se han encontrado lectinas en prácticamente toda la escala biológica, desde virus hasta vertebrados, y en cada organismo se han propuesto diferentes funciones: interacciones célula-célula, participación en la adhesión celular (McCoy *et al.* 1994). En los vegetales, se han asociado con el transporte, inmovilización y almacenamiento de carbohidratos (Hernández *et al.* 1998), debido a la toxicidad de algunas de ellas, se ha sugerido que tienen participación en la defensa de los vegetales contra hongos fitopatógenos (Mirelman *et al.* 1975), también se han

Tabla 1. Algunas lectinas caracterizadas de artrópodos.

Especie	Peso Molecular (kDa)	Sub-unidades (kDa)	Azúcar o glicopéptido específico *	Referencias
Cucaracha de mar				
<i>Limulus polyphemus</i>	400	18, 24	NeuAc, GalNAc, PC, KDO	Cohen, 1968; Marchalonis & Edelman, 1968; Kaplan <i>et al.</i> 1977; Rostam-Abadi & Pistole, 1982.
<i>Carcinoscorpius rotunda cauda</i>	420	27, 28	NeuAc, GalNAc, KDO, PC	Bishayee & Dorai, 1980; Mohan <i>et al.</i> 1982; Dorai <i>et al.</i> 1982.
<i>Tachypleus tridentatus</i>	24-470		KDO, LPS	Shishikura & Sekiguchi, 1984; Tsuboi <i>et al.</i> 1993; Iwanaga & Kawabata 1999.
Cangrejos				
<i>Cancer antennarius</i>	70-140	36	NeuAc	Ravindranath <i>et al.</i> 1985
<i>Cancer japonicus</i>	300	19	α -gal, α -glc	Umetsu <i>et al.</i> 1991
<i>Birgus latro</i>			NeuAc	Cohen, 1968; Vasta & Cohen, 1984.
<i>Silla serrata</i>	55, 70	25-30	NeuGc, BMS, ácido colómico, fetuina	Mercy & Ravindranath, 1993; Kongtawelert, 1998.
<i>Liocarcinus depurator</i>	700	38	NeuAc, BMS, LPS	Fragkiadakis & Stratakis, 1997.
Langosta				
<i>Homarus americanus</i>	11-19	55	NeuAc, GalNAc	Hall & Rowlands 1974; Hall & Wang, 1974.
<i>Jasus novaehollandiae</i>	400	85, 81, 63	D-Rib, D-Ara, D-Man D-Gal, D-GluN, PSM, fetuina	Imai <i>et al.</i> 1994.

Tabla 1. Algunas lectinas caracterizadas de artrópodos (continuación).

Especie	Peso Molecular (kDa)	Sub-unidades (kDa)	Azúcar o glicopéptido específico *	Referencias
Langostino de agua dulce				
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	19	9.5	NeuAc, GalNAc, GlcNAc	Vázquez <i>et al.</i> 1993.
Cangrejo de río				
<i>Pacifastacus leniusculus</i>	420	65-80	PSM, BSM, LPS, fetuina	Kopacek <i>et al.</i> 1993.
Bellota de mar				
<i>Megabalanus rosa</i>	64-330	16-22	Gal	Muramoto <i>et al.</i> 1985.
<i>Balanus rostratus</i>	120	25	Gal, Lac, Mel	Toda <i>et al.</i> 1998.
Camarón mantis				
<i>Squilla mantis</i>	192		L-Fuc, GalNAc	Amirante & Basso, 1984.
Camarones				
<i>Peneus japonicus</i>	330	33	Rib, GlcNAc, BMS, GalNAc, NeuAc, PSM.	Freire-Márquez & Barracco, 2000.
<i>P. californiensis</i>	175	41	GlcNAc, GalNAc, NeuAc, BMS	Freire-Márquez & Barracco, 2000.
<i>P. monodon</i>	420	27	GlcNAc, GalNAc, ManNAc, NeuAc, BMS	Freire-Márquez & Barracco, 2000.
<i>P. Schimitti</i>	153	31-34	NeuAc, GlcNAc, GalNAc	Freire-Márquez & Barracco, 2000.

GalNAc= N-acetil galactosamina, GlcNAc= N-acetil glucosamina, ManNAc= N-acetil manosamina, NeuAc= ácido N-acetil neuranimico, NeuGc= ácido N-glicolil neuranimico, BMS= mucina bovina, KDO= 2-ceto-3-deoxioctonato, LPS= lipopolisacarido, PC= fosfocolina, PSM= mucina porcina.

encontrado algunas evidencias de su participación en el reconocimiento de moléculas extrañas (Pusztai, 1991), o en la unión de bacterias fijadoras de nitrógeno, del género *Rhizobium* por lectinas de leguminosas (Dazzo & Sherwodd, 1983).

Las funciones biológicas de las lectinas de animales son muy diversas: favorecen la adhesión celular, por parte de galectinas (Lis & Sharon, 1998), además, les han adjudicado alguna responsabilidad en la metástasis de células cancerígenas en ratones y humanos (Lis & Sharon, 1998), otro tipo de lectinas, las lectinas endocíticas son receptores de membrana, por ejemplo, el receptor de asialoglicoproteína hepática de mamífero, facilita la eliminación de la circulación de glicoproteínas con unidades complejas de oligosacáridos (Ashwell & Harford, 1982). Las lectinas también se han visto involucradas en la respuesta inmune innata, en dos rutas, por un lado en la defensa contra microbios, el receptor específico de manosa presente en macrófagos, provoca la lectinofagocitosis (Ofek *et al.* 1995) y por otro lado la activación del complemento, con las lectinas MBL (por sus siglas en inglés "Mannose Binding Lectin"), las cuales se unen a oligomanósidos de microorganismos infecciosos y con ello activan el complemento (Drickamer & Taylor, 1993). Las MBL solubles también funcionan como opsoninas. Las selectinas son proteínas que poseen un dominio que reconoce estructuras glicosiladas (Pusztai, 1991), se les ha atribuido la función de mediar la adhesión de leucocitos circulantes al endotelio de los vasos sanguíneos, además de estar involucrada en la recirculación de linfocitos en ganglios linfoides (McEver *et al.* 1995), otras son activadas por mediadores inflamatorios como las selectinas E y P (McEver *et al.* 1995), las lectinas del tipo de receptores de manosa 6 fosfato, sirven como señal a enzimas lisosomales, en el transporte subcelular (Kornfeld, 1992). Finalmente algunas otras lectinas están involucradas en la biosíntesis, distribución, tráfico y conducción de glicoproteínas a la superficie celular, por ejemplo, la calreticulina se une temporalmente a la glucosa terminal de oligosacáridos, controlando el ensamble y plegamiento de las glicoproteínas (Spero *et al.* 1996).

La existencia de las lectinas ha sido conocida desde hace más de cien años (Lis & Sharon, 1986). Las primeras lectinas detectadas fueron las de origen vegetal, sin embargo desde hace varias décadas se ha enfocado la atención en lectinas presentes en vertebrados así como a las identificadas en la hemolinfa y extracto tisular de diferentes especies de invertebrados (Drickamer & Taylor, 1993; Arason, 1996). Las lectinas de invertebrados han sido aisladas principalmente en la hemolinfa y órganos sexuales, así como en glándulas de albúmina y huevos (Komano & Natori, 1985; Arason, 1996). Algunos resultados han demostrado que las lectinas están presentes también en membranas de células sanguíneas o hemocitos (Sierra *et al.* 1998). Una de las funciones de estos grupos celulares es la del reconocimiento de elementos no propios de los invertebrados, los cuales se eliminarían por un proceso de fagocitosis, este aspecto es interesante debido a que es posible considerar que en los hemocitos, las lectinas funcionarían como un elemento de reconocimiento específico (aunque primitivo), de protección inmunológica.

La presencia de lectinas en los crustáceos ha sido bien establecida en una serie de reportes de los cuales uno de los pioneros fue Cantacuzene en 1912 (Sharon & Lis, 1987). Se ha sugerido que estas moléculas representan un papel muy importante y hasta ahora la función de las lectinas de invertebrados no se conoce con exactitud, sin embargo además de representar la primer barrera específica de protección contra organismos depredadores (Arason, 1996; Muta & Iwanaga, 1996), en los embriones de *Tachypleus gigas* (Shishikura & Sekiguchi, 1984) las lectinas confieren protección al huevo contra el patógeno, y además se les asocia con el transporte, inmovilización y almacenamiento de carbohidratos (Mauchamp, 1982).

La actividad aglutinante hacia eritrocitos, como una actividad característica de las lectinas, ha sido identificada en la hemolinfa de muchos organismos invertebrados (Johnson, 1964; Cohen, 1968; Hall & Rowlands, 1974; Baldo *et al.* 1978; Shishikura & Sekiguchi, 1984); en algunos casos se ha demostrado que la actividad aglutinante es específica por los eritrocitos de alguna especie o grupo sanguíneo en particular. Uhlenbruck y Prokop (1966), reportaron la existencia de

una aglutinina específica para eritrocitos humanos de tipo A en el caracol de jardín *Helix sp.*; este efecto se debe a que el determinante de grupo sanguíneo en estos eritrocitos es la GalNAc en posición terminal no reductora (Viele *et al.* 1997), por esa razón, este carbohidrato es específico para inhibir la hemaglutinación inducida por la hemolinfa de este organismo.

Entre las lectinas que han sido purificadas y caracterizadas en invertebrados, se encuentran la del cangrejo *Limulus polyphemus* (Marchalonis & Edelman, 1968), *Carcinoscorpius rotunda cauda* (Mohan *et al.* 1982), la de la langosta *Homarus americanus* (Hall & Rowlands, 1974; Hall & Wang, 1974), de la almeja *Tridacna maxima* (Baldo *et al.* 1978) y de la babosa *Limax flavus* (Miller, 1987) el caracol *Helix pomatia* (Uhlenbruck & Prokop, 1966), entre otras (Tabla 1). Se ha demostrado que la mayor parte de las lectinas de la hemolinfa de crustáceos son específicas a ácido siálico. Recientemente se identificó a una lectina específica a derivados de ácido siálico 9-O-acetilado y 4-O-acetilado en la hemolinfa del cangrejo *Cancer antennarius* (Ravindranath *et al.* 1985); múltiples lectinas están presentes en la hemolinfa del cangrejo cocotero *Birgus latro*, también entre ellas se encuentran algunas que son específicas a ácido siálico (Vasta & Cohen 1984; Tabla 1). Vasta *et al.* (1983), identificaron en la hemolinfa del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, actividad hemaglutinante la cual se inhibe con diversos carbohidratos. En otras especies la actividad biológica de las lectinas depende de calcio (Drickamer, 1993), estas lectinas son denominadas lectinas C (dependientes de cationes divalentes).

Recientemente se ha identificado una lectina de la hemolinfa del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (MrL). El análisis inicial realizado a esta lectina (Vázquez *et al.* 1993) nos indica que aglutina eritrocitos de rata y conejo, y cuando estos eritrocitos fueron tratados con neuraminidasa de *Clostridium perfringens*, la actividad hemaglutinante disminuyó un 50%, lo que sugiere que esta lectina tiene especificidad por NeuAc, GlcNAc y GalNAc y su función aglutinante es dependiente de la presencia de cationes divalentes. Se ha propuesto que la lectina tiene participación en el reconocimiento de material extraño, debido a la capacidad de reconocer algunas bacterias patógenas a invertebrados, tales como especies

de *Aeromonas* y de *Bacillus cereus* (Vázquez *et al.* 1996). Se ha sugerido que la lectina esta asociada a componentes de membrana celular de células granulares de 68 y 72 kDa (Vázquez *et al.* 1997), por lo que se considera que estas células promueven la fagocitosis. Estudios ultraestructurales con anticuerpos policlonales (Sierra *et al.* 1998) permitieron identificar lectina en el complejo de Golgi, en estructuras parecidas a gránulos de secreción en hemocitos y en la membrana plasmática. Se ha considerado que los hemocitos granulares son, por lo tanto, como el sitio de síntesis de la lectina en el langostino. Se ha observado que la lectina tiene funciones en el sistema inmune del crustáceo, como una opsonina y posiblemente en algún proceso de regulación endocrina.

Ácido siálico

Por mucho tiempo, los carbohidratos se han considerado como moléculas energéticas, sin embargo, en años recientes su relevancia ha cambiado, ya que se ha visto que tienen otras funciones de gran importancia como moléculas portadoras de información. El azúcar que nos interesa, por ser el reconocido por la lectina del langostino, es el ácido siálico, este monosacárido de 9 carbonos (Figura 1), normalmente se localiza en posición terminal de las cadenas oligosacáridicas, posee un carboxilo en el carbono uno, típicamente ionizado, siendo el único carbohidrato con carga negativa a pH fisiológico (Varki, 1992).

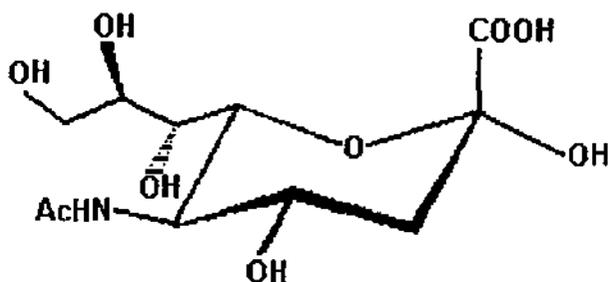


Figura 1. Estructura de Neu5Ac.

Este carbohidrato y sus derivados así como los sialoconjugados, intervienen en diversos procesos, entre los cuales se observa participación en la

discriminación de lo propio y lo extraño. Glicopéptidos conteniendo ácido siálico funcionan protegiendo contra el ataque de anticuerpos naturales, activación del complemento, fagocitosis mediada por macrófagos, citotoxicidad mediada por linfocitos, y contra células NK, ya que en todos estos casos la pérdida de ácido siálico en estructuras propias, desencadena la activación y función de mecanismos protectores (Pilatte *et al.* 1993).

El ácido siálico también participa en la regulación de procesos inmunológicos, en la forma de reconocimiento, se han observado una cantidad importante de moléculas que reconocen ácido siálico, tal es el caso de las selectinas (McEver *et al.* 1995), en general estas lectinas reconocen antígenos del tipo sialil lewis x, de este modo se da la adhesión celular; por otra parte se ha propuesto que el CD22 en células B maduras, puede modular la interacción con otras células (Varki, 1997), interactúa con CD45RO en células T y CD75 con células B. En la maduración de timocitos el ácido siálico protege contra la apoptosis (Álvarez *et al.* 1999).

La participación del ácido siálico se ha puesto de manifiesto en procesos malignos, por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer y ciertos tipos de cáncer (Singhal & Hakomori, 1990; Guevara *et al.* 1998), en donde los patrones de glicosilación aberrantes, incrementan la cantidad de ácido siálico en las proteínas de superficie.

JUSTIFICACIÓN

En México existen doce especies de *Macrobrachium*, algunas de ellas son explotadas en cultivos semintensivos, ya que estos organismos tienen un alto contenido de proteínas. En el estado de Morelos, se establecieron programas de cultivo del langostino en granjas comunitarias dedicadas al cultivo del langostino malayo, *Macrobrachium rosenbergii*, por las características de la especie, tales como la tolerancia para su manejo en cultivo y la resistencia a las variaciones de los principales parámetros ambientales.

Los monitoreos de sanidad acuícola en otros países dedicados al cultivo y engorda del langostino como Tailandia y Hawai, han mostrado que en los diferentes estadios de desarrollo de esta especie pueden ser afectados por diversos patógenos: algunos virus, el parvovirus (parvovirus-like), algunas bacterias quitinolíticas y filamentosas (*Vibrio* sp, *Beneckeia* sp, *Pseudomonas*, *Aeromonas* sp y *Mycobacterium* sp), Rickettsias; protozoarios (*Epistylis*, *Zoothamnium*, *Lagenophrys* sp y *Vorticella*), hongos (*Lagenidium callinectes*, *Sirolopidium* sp., *Fusarium* y Tricomícetos), insectos (huevo-cillos de *Ramphocorixa acuminata*), el tremátodo *Carneophallus choanophallus*, el nemátodo *Angiostrongylus cantonensis* e isópodos (*Probopyrus* sp), que afectan al langostino. Estos patógenos pueden llegar a causar merma importante en la producción (Bautista, 1988; Brock, 1993) principalmente en los primeros estadios de desarrollo, donde se ha observado una alta mortalidad.

La inmunidad es un mecanismo de defensa que se activa específicamente en un organismo ante la presencia de agentes patógenos de moléculas extrañas. Los mecanismos de defensa en crustáceos están dados por la cooperación de mecanismos humorales y celulares (Drickamer & Taylor, 1993; Vázquez *et al.* 1997; Vázquez *et al.* 1998; Freire-Márquez & Barracco, 2000), sin embargo, se caracteriza por la carencia de memoria. Se han identificado lectinas presentes en la hemolinfa de los invertebrados y se han propuesto diversas funciones para ellas, las cuales incluyen participación en la agregación celular, fertilización, desarrollo embriogénico y transporte de carbohidratos complejos (Rostam-Abadi &

Pistole, 1982; Drickamer & Taylor, 1993; Arason, 1996; Vázquez *et al.* 1997; Vázquez *et al.* 1998; Iwanaga & Kawabata, 1999; Freire-Márquez & Barracco, 2000), pero su papel específico aun no se ha definido con claridad.

Una limitante en la identificación de la función específica de las lectinas en los invertebrados como en los artrópodos, se debe a que se desconoce la concentración de estas proteínas en esos organismos, y aún más se desconoce la proporción en la que se encuentra durante los estadios de desarrollo, por lo que con la caracterización de la lectina presente en la hemolinfa del langostino *M. rosenbergii*, podría proporcionar información acerca de su estructura y de la función en los crustáceos, y con la cuantificación de la lectina en los diferentes estadios de maduración del langostino, se podrá mejorar el rendimiento en la purificación de la misma. La obtención de anticuerpos monoclonales contra la lectina podría ser utilizado como una herramienta para la purificación, caracterización y la cuantificación de la lectina.

El uso de lectinas por su especificidad por carbohidratos, las convierte también en una herramienta útil para el análisis de diversos glicoconjugados, e incluso para el diagnóstico de patologías de ciertos tipos de tumores, infecciones virales o bacterianas. Por el reconocimiento hacia el ácido siálico de la lectina del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, se propone caracterizarla para utilizarla como posible herramienta en el diagnóstico clínico.

HIPÓTESIS

La lectina del tangostino, tiene funciones en los mecanismos de defensa del organismo, análogas a anticuerpos.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (MrL) y cuantificar la cantidad y actividad presente de ella en la hemolinfa de diferentes estadios de desarrollo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Purificar a la lectina de la hemolinfa del langostino por cromatografía de afinidad.
- 2.- Obtener, caracterizar y purificar un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra la lectina MrL.
- 3.- Determinar la concentración de lectina en la hemolinfa de diferentes estadios de desarrollo, por ELISA empleando anticuerpos monoclonales.
- 4.- Determinar la actividad aglutinante de la lectina presente en la hemolinfa de diferentes estadios de crecimiento del langostino
- 5.- Determinar la especificidad de la lectina presente en la hemolinfa de diferentes estadios, por azúcares y glicoproteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

ORGANISMOS

Langostinos (*M. rosenbergii*) se colectaron en la granja acuícola "el Higuerón", en Jojutla, Morelos, México, donde se engordan en estanques rústicos en combinación con peces. Los estadios de muda se identificaron de acuerdo al método descrito por Peebles (1977) y los estadios de maduración, basados en peso y características corporales como lo sugirió Wickins & Beard (1974). Los animales se clasificaron en cuatro grupos de acuerdo a los estadios de maduración: Juvenil I o postlarva, animales con 7 ± 0.5 cm de longitud, Juvenil II de 9.1 ± 0.8 cm de longitud; Adulto I fueron los organismos en intermuda de 10.3 ± 0.9 cm y Adultos II de 11.9 ± 1 cm de longitud.

PURIFICACIÓN DE LECTINA

La hemolinfa se obtuvo de los organismos de la zona pericárdica del langostino usando una jeringa de 5 ml con aguja de 21x32 mm, posteriormente se centrifugó a 30 000 g por 30 min a 4°C, el sobrenadante fue dializado contra TBS (Tris-hidroximetilaminometano [Tris] 0.5 mM, pH 7.4, NaCl 0.15M, CaCl₂ 30 nM), con dos cambios y se almacenó a -70°C hasta su uso. La purificación de la lectina sérica se realizó a partir de la hemolinfa de organismos Juvenil I y Adulto I por cromatografía de afinidad en una columna conteniendo estroma de eritrocitos de rata, inmovilizada físicamente en Sephadex G-25 superfino (Pharmacia Chemicals, Uppsala Sweden). El estroma de eritrocitos fue tratado con glutaraldehído al 1.5% antes de ser aplicado a la columna, según el método descrito por Vázquez *et al.* (1993). Se aplicaron 400 µl de hemolinfa a la columna previamente equilibrada con TBS con un flujo de 10 ml/h. La columna se lavó con TBS para eliminar el material no retenido hasta tener una absorbancia menor a 0.001 a 280 nm. Posteriormente la lectina se eluyó con ácido acético al 3% en agua desionizada y el pH se neutralizó hasta 6.0 con NaOH 1M. A cada fracción colectada de 2 ml, se le determinó absorbancia a 280 nm y actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de rata al 2 % en TBS. Las fracciones eluidas de la columna de afinidad fueron concentradas por ultrafiltración en una

cámara Amicon (Amicon Colexington, Mass.) utilizando membranas PM/10 (límite de filtración de 10 kDa). La lectina se conservó a -70°C hasta su uso.

ANTICUERPOS MONOCLONALES: Para la obtención de anticuerpos monoclonales para el antígeno MrL, se siguió el método de hibridación propuesto por Köhler & Milstein (1975) utilizando las modificaciones propuestas por Harlow & Lane (1998), todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Inmunización: Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de cuatro semanas de edad y 20-25 g de peso, con 70 μg de MrL en Adyuvante Completo de Freund (Gibco Laboratories Inc., Grand Island, N.Y.; 1:1, relación v:v), se realizaron inmunizaciones cada 15 días, con diferentes concentraciones de proteínas (ver tabla 2). Tres días después de la última inmunización, los ratones se sangraron del plexo retroorbital y se determinó el título del suero, mediante ELISA (Engvall & Perlmann, 1971). Con el bazo del ratón que presentó mayor título contra el antígeno (MrL), se procedió a efectuar la fusión celular para la obtención de hibridomas.

Tabla 2. Esquema de inmunización de los ratones de fusión.

Día	MrL pura	Vía de inmunización *
0	70 μg	I. P.
15	50 μg	I. P.
30	50 μg	I. P.
45	50 μg	I. P.
60	50 μg	I. P.
64	Sangrado del ratón y probar el suero por ELISA.	

* I. P. Intra Peritoneal

Nota: las inmunizaciones se realizaron con Adyuvante Completo de Freund.

ELISA: El antígeno se diluyó con amortiguador de carbonatos (0.1 M pH 9.6) a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se sensibilizan los pozos de placas de

poliestireno (Nunc, Naperville, IL.) con 100 µl de la solución de antígeno incubándola 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, después de cinco lavadas con PBS (0.1M, NaCl 0.15M, pH 7.2) 0.01% Tween 20 (PBS-T), se bloquearon los sitios reactivos con leche descremada al 5% en PBS durante 90 min a 37°C y se repitió el lavado, posteriormente se incubó con el anti-suero de ratón 90 min a 37°C, se lavó 6 veces con PBS-T y se incubaron 90 min a 37°C con el conjugado anti-ratón (Sigma, St Louis Mo. 1:1000; anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa), las placas se lavaron y la reacción se reveló incubando la placa con 100 µl del sustrato (OPD 0.04 % y H₂O₂ 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M pH 5) a temperatura ambiente en oscuridad (como máximo 30 min), la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 3N, finalmente las placas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000).

Obtención de macrófagos peritoneales. Se sacrificó al ratón por dislocamiento cervical y una vez fijo a la tabla de disección se realizó una incisión en el bajo vientre cortando longitudinalmente la piel, abriéndola en libro, posteriormente se inyectaron 5 ml de PBS, el peritoneo se lavó por masaje y se recuperó el líquido peritoneal con una jeringa, resuspendiéndolo varias veces. El líquido resuspendido se colocó en tubos en hielo; se repitió el lavado del peritoneo con otros 5 ml de PBS. Una vez obtenido el líquido de varios animales, se centrifugó a 300 g/10 min a 4°C, descartando el sobrenadante y el botón celular se homogeneizó con una pipeta Pasteur en medio DMEM (Sigma) complementado con penicilina G sódica (100 U/ml), gentamicina (100 U/ml), glicina (200 mM), β-mercaptoetanol (0.01 M), estreptomycin (100 mg/ml) y L-glutamina (200 mM); y SFB (Sigma) al 20% (v/v) (DMEM complementado), Las células se contaron en hemocitómetro y se llevó a una concentración de 5 X 10⁵ células/ml, se colocaron 100 µl de la suspensión en cada pozo, de placas de cultivo de 96 pozos y después de incubar 24 h a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂; se cambió el medio para eliminar las células no adherentes y dejar la monocapa de macrófagos, sobre la cual se sembraron las células de la mezcla de fusión.

Obtención de la suspensión de células de bazo: Se sacrificó al ratón por dislocamiento cervical y una vez fijo a la tabla de disección se roció alcohol al

70%, se cortó la piel del abdomen y se retiró, para evitar la contaminación por el pelo; Se removió el bazo y se depositó sobre un cuadro de tela de organza estéril (para disgregar el bazo) dentro de una caja de Petri con 4-5 ml de DMEM; el bazo se disgregó con la ayuda de un émbolo de jeringa y se resuspendió con pipeta Pasteur; la suspensión de células se lavó tres veces con medio DMEM a 300 g durante 10 min a 4°C; finalmente, se cuantificaron las células en un hemocitómetro.

Preparación de células de mieloma: Las células de mieloma murino P3-x63-Ag8 (Ag8) se mantuvieron en medio DMEM complementado con SFB al 10% (v/v), se sembraron 2 botellas de 25 cm² con 5x10⁶ células de mieloma/botella, un día anterior a la fusión; el día de la fusión se separaron las células de la botella, por agitación suave y se colocaron en un tubo cónico de 50 ml centrifugando a 300 g durante 10 min a 4°C, las células se lavaron tres veces con medio DMEM y se contaron en hemocitómetro.

Fusión celular: Las células de bazo y de mieloma se mezclaron en una relación 5:1 (linfocitos:mieloma) en tubo de 50 ml, se centrifugaron a 300 g/10 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante, en el mismo tubo se resuspendieron suavemente y se agregó 0.1 ml de polietilenglicol-4000 (Gibco), por cada 10⁶ células, el tubo se agitó suavemente por 45 s y se agregaron 5 ml de medio, se agitó otros 5 min y se agregó medio DMEM con 20% de SFB, ajustando la mezcla a un volumen final de 10 ml, se depositaron 50 µl de esta suspensión, a cada pozo, de placas de cultivo de 96 pozos, conteniendo macrófagos peritoneales y se incubaron a 37°C con atmósfera húmeda de CO₂ al 5%; después de tres días se retiró la mitad del medio y se reemplazó por el mismo volumen de medio HAT (Hipoxantina 10 mM, Aminopterin 0.04 mM y Timidina 1.6 mM en medio DMEM 20% SFB, Sigma), para realizar la selección de los híbridos, alimentándolos cada tercer día cambiando siempre la mitad del medio, durante 14 días, después se les cambio a medio HT (Hipoxantina 10 mM y Timidina 1.6 mM en medio DMEM 20% SFB, Sigma) siete días más y por último, se adicionó medio DMEM-20% SFB, las placas se revisaron diariamente en microscopio invertido (Olympus IMT-2) hasta observar las colonias de híbridos. Se seleccionaron los híbridos con mayor

reactividad inmunológica, midiendo en el sobrenadante los anticuerpos producidos, por el método de ELISA y se clonaron.

Clonación de híbridos: Los híbridos reactivos al antígeno se clonaron por el método de dilución limitante, dos días antes de la clonación se obtuvieron macrófagos en placas de 96 pozos, para utilizarlos como células alimentadoras. Los híbridos se contaron y diluyeron hasta obtener una suspensión celular a la concentración de 20 células/ml y se depositaron 50 μ l de la suspensión anterior, en cada pozo conteniendo macrófagos, se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, el tiempo necesario a la aparición de colonias, se seleccionaron los pozos que contenían una colonia y se resuspendió y creció en otros pozos y luego en botellas de cultivo de 25 cm², de cada híbrido se hicieron cuatro reclonaciones, monitoreando y seleccionando, en cada una, las que presenten mayor título por ELISA.

Criopreservación de células, en cada paso posterior a la selección de híbridos positivos al antígeno se prepararon suspensiones de 5×10^6 células y se centrifugaron a 300 g durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió en la solución crioprotectora (SFB:DMSO, en proporción 10:1), se colocó la suspensión en viales de congelación y se enfrió a -70°C 24 h y finalmente se conservó en nitrógeno líquido; Si es necesario, se descongelan las células sacando el vial del nitrógeno líquido y pasándolo a 4°C 2 h y posteriormente a baño María a 37°C. Las células se transfieren a un tubo cónico con 8 ml de DMEM complementado; se centrifugaron a 300 g/10 min a 4°C y finalmente, el botón fue resuspendido en 7 ml de DMEM complementado y las células se cultivaron en botellas a 37°C y 5% de CO₂.

Caracterización de los anticuerpos monoclonales: Para la determinación de isotipos y subclases de los anticuerpos monoclonales, se utilizó un kit para determinación de isotipos por el método de ELISA (Bio Rad, Hercules Ca.): se procedió a fijar al antígeno a la placa de poliestireno (Nunc) con 100 μ l de la solución de antígeno (100 μ g/ml en amortiguador de carbonatos), incubándola 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, después de cinco lavadas con PBS (0.1M, NaCl 0.15M, pH 7.2) 0.01% Tween 20 (PBS-T), se bloquearon los pozos con leche

descremada al 5% en PBS 90 min a 37°C y se repitió el lavado, se incubaron 100 µl de sobrenadantes conteniendo anticuerpos monoclonales 1h a 37°C y toda la noche a 4°C, posteriormente se lavaron y se incubaron con 100 µl de anticuerpos anti-IgM, anti-IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, anti-IgA, cadena λ y cadena κ de ratón (Bio Rad), incubándose 1 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS-T. Se agregaron 100 µl del conjugado acoplado a peroxidasa y se incubó 1 h a temperatura ambiente, se repitió el lavado con PBS-T y se reveló con 100 µl del sustrato, incubando a temperatura ambiente en oscuridad máximo 30 min, la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 3N. Se realizó la lectura a 492 nm en lector de ELISA (Dynatech MR5000). Se utilizó sobrenadante del cultivo celular Ag8 como testigo negativo y suero de ratón anti MrL como control positivo.

Producción de líquido de ascitis: para la obtención de líquido de ascitis se utilizaron ratones BALB/c hembras, se administraron las células híbridas intraperitonealmente (10^6 células híbridas/ml) con pristano (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano, Sigma) en proporción 1:1 medio:pristano, máximo 0.5 ml. El líquido de ascitis se recolectó después de la formación de tumor ascítico y se almacenó a -20°C hasta su uso.

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

Precipitación con sulfato de amonio: se realizó según el método descrito por Harlow & Lane (1998), el material a precipitar se centrifugó a 12 000 g por 30 min y el sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitado con agitación suave, se agregó lentamente sulfato de amonio saturado hasta llegar a una concentración final de 50% de saturación, para asegurar la precipitación de los anticuerpos se mantuvo a 4°C toda la noche. Se centrifugó el precipitado a 12 000 g 30 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 10 ml de SSI (0.85%). Se repitió dos veces más el proceso de precipitación y finalmente se resuspendió en dos ml de SSI, se transfirió a tubo de diálisis y se dializó exhaustivamente contra SSI, hasta la eliminación del sulfato de amonio, se centrifugó a 12 000 g, se determinó la concentración de proteínas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Purificación en DEAE-Sephadex. se realizó según el método descrito por Garvey *et al.* (1977), se preparó una columna con DEAE-Sephadex (Sigma) de la siguiente manera: se lavó exhaustivamente con HCl 0.5 N, Tris 10 mM (pH 8.5), NaOH 0.5 N, este procedimiento se repitió y se equilibró con Tris 10 mM, pH 8.5, por otro lado se dializaron las inmunoglobulinas con Tris (10 mM, pH 8.5), se aplicó 1 ml (5 mg) de los anticuerpos dializados a la columna y se lavó con tris, se eluyó con un gradiente discontinuo de 0 a 500 mM de NaCl con aumento constante del eluyente (comenzando en 50 mM y hasta 500 mM), se tomaron fracciones de 5 ml y se leyeron en espectrofotómetro (Beckman DU640) a 280 nm. De cada fracción, se determinó la cantidad de proteína y la presencia del anticuerpo por SDS-PAGE.

Purificación en Mono Q: se utilizó una columna de intercambio aniónico mono Q HR 5/5 (50 x 5 mm) en sistema de FPLC (Pharmacia) con las modificaciones propuestas por Clezardin *et al.* (1985). El anticuerpo se dializó con TEA-HCl 20 mM (pH 7.7), posteriormente se pasó a través de filtros de 0.22 μ m (Millipore, Bedford, Ma.). Dependiendo de la muestra, se aplicaron 1 o 5 mg de proteína en 500 μ l a la columna, para eluir se utilizó un gradiente lineal de 0 a 0.35 M de NaCl en la misma solución, en 25 min a un flujo de 1 ml/min. Se colectaron fracciones, de 1 ml y se monitorearon a una A_{280} nm con una sensibilidad de 0.1. De cada fracción, se determinó la cantidad de proteína y la presencia del anticuerpo por SDS-PAGE.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA

Procedimientos analíticos.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La composición de aminoácidos se determinó con 100 μ g de lectina purificada en 30 μ l de fenol al 0.3%, para prevenir la degradación de los residuos de tirosina, la mezcla se sometió a hidrólisis con 2 ml de HCl 6N a 110°C 24 h con vacío. La composición de aminoácidos se determinó en un analizador de aminoácidos Beckman 119-CL, según la metodología propuesta Bidlingmeyer *et al.* (1984).

La concentración y composición de carbohidratos de la lectina *M. rosenbergii* se realizó por cromatografía de gases con derivados alditoles trifluoroacetilados; se hidrolizaron 50 µg de lectina en 1 ml de metanol/HCl 0.5 N durante 24 h a 100°C, posteriormente los derivados trifluoro-acetil-aditales se realizaron adicionando 100 µl de piridina y 100 µl de ácido trifluoroacético. La composición de los azúcares se determinó por el método de Zanetta *et al.* (1999), en un cromatógrafo de gas Varian 2100 (Orsay, Francia), agregando los derivados trifluoro-acetil-aditales a una columna capilar (25x0.32 mm), conteniendo silicón OV-210 al 5% (Applied Science Lab., Buffalo NY); el programa de temperatura se estableció de 100 a 240°C, con un incremento de 2°C por minuto. Como estándar interno se utilizó lisina.

Determinación del peso molecular de la lectina. El peso molecular y el grado de homogeneidad de la lectina purificada por cromatografía de afinidad fue evaluada en electroforesis de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles con poliacrilamida al 10% y SDS, en condiciones reductoras. Las muestras conteniendo entre 10 a 75 µg/ml se diluyeron 1:2 en amortiguador de muestra (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-MSH 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8). La mezcla de la muestra con el amortiguador se sometió a ebullición en baño seco por 10 min. Se utilizaron estándares de peso molecular para tinción con azul de Coomassie (Sigma), con rango de 6.5 a 66 kDa. La migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 100 V, en amortiguador de corrida (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M y SDS 0.1%, pH 8.3). Se calcularon los Rf de los estándares con la fórmula: $RF = \text{Distancia de migración de la proteína} / \text{Distancia de migración del colorante}$. Los pesos moleculares fueron calculados en la gráfica de PM vs. Rf, interpolando los valores del Rf de la lectina en el Rf de los patrones de pesos moleculares.

Inmuno-electrotransferencia: se empleó el método descrito por Towbin *et al.* (1979). Después de la electroforesis cada gel se incubó en amortiguador de transferencia (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3). La transferencia a membranas de nitrocelulosa, se realizó en un aparato Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio Rad) a temperatura ambiente con voltaje

constante 25 V durante 1h, en amortiguador de transferencia. Transferido el gel a la membrana de nitrocelulosa, se bloquearon los sitios reactivos libres con leche descremada al 5% en PBS durante 1.5 h. Se añadió sobrenadante de cultivo (conteniendo los anticuerpos monoclonales), incubándose a 37°C por 90 minutos y toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con PBS-Tween (4 veces, 10 min cada lavado). Se agregaron anticuerpos anti-ratón acoplados a peroxidasa (sigma), diluidos en PBS 1:200 y se incubaron 90 min a 37°C. Posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween 4 veces, por 10 min cada lavado y dos más con PBS. Se reveló con el sustrato de la enzima utilizada (4-cloro-1-naftol 0.05%, metanol 20%, H₂O₂ 0.015% en PBS pH 7.2), la solución se agregó sobre la(s) membrana(s) con agitación ligera, a temperatura ambiente, hasta la aparición de las bandas. La reacción se detuvo con agua destilada, los pesos moleculares no se bloquearon y se tiñeron con amido negro (Bio Rad) al 0.02%.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LECTINA EN DIFERENTES ESTADIOS DEL LANGOSTINO *M. rosenbergii*.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal en la determinación de la concentración de lectina, para ello se acopló a peroxidasa según el método descrito por Avrameas & Ternyck (1971) de la siguiente manera: se activaron 10 mg de peroxidasa de rábano fuerte tipo VI (Sigma) en una solución de glutaraldehído 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.8 por 18 h a temperatura ambiente. Posteriormente se dializó 24 h contra amortiguador de carbonatos 1 M, pH 9.5. Se mezcló la enzima activada con 1 ml de anticuerpo monoclonal BE3D6B11F9 previamente dializado contra NaCl 0.15 M a una concentración de 5 mg/ml. Se mezcló y dejó reposar 24 h a 4°C. Finalmente se agregó 0.1 ml de L-lisina 1 M 2 h y se dializó contra PBS toda la noche.

Una vez acoplado el Mab 1F9 a peroxidasa, se procedió a titularlo por ELISA en forma de tablero de ajedrez de la siguiente manera: se fijaron concentraciones crecientes de lectina por columna horizontal de la placa de poliestireno, incubándola en amortiguador de carbonatos (0.1 M, pH 9.6) 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, después de cinco lavadas con PBS-T, se bloquearon

los pozos con leche descremada al 5% en PBS 90 min a 37°C y se repitió el lavado, posteriormente se incubaron diluciones del MAb acoplado a peroxidasa por columna vertical, 90 min a 37°C, las placas se lavaron 6 veces con PBS-T y la reacción se reveló incubando la placa con 100 µl del sustrato (OPD 0.04 % y H₂O₂ 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M pH 5) a temperatura ambiente en oscuridad (como máximo 30 min), la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 3N, finalmente las placas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA. Se seleccionó la dilución del anticuerpo que presentó una D.O. de 1 (dilución 1:400).

Para la determinación de la concentración de lectina de hemolinfa de diferentes estadios, se estandarizó una curva de ELISA con concentraciones crecientes de lectina purificada de organismos adultos y juveniles, la lectina se fijó en la placa de micro titulación de poliestireno (Nunc), incubándola en amortiguador de carbonatos 0.1 M (pH 9.6) 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, después de cinco lavadas con PBS-T, se bloquearon los pozos con leche descremada al 5% en PBS 90 min a 37°C y se repitió el lavado, se incubaron 90 min a 37°C con el anticuerpo monoclonal acoplado a peroxidasa (1:400), las placas se lavaron 6 veces con PBS-T y la reacción se reveló incubando la placa con 100 µl del sustrato (OPD 0.04 % y H₂O₂ 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5) a temperatura ambiente en oscuridad (como máximo 30 min), la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de HCl 3N, finalmente las placas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA. La prueba se realizó por triplicado. Se construyó la curva estándar graficando el promedio de los datos obtenidos, el eje de las ordenadas representa la concentración de lectina y el de las abscisas la D.O. que presentó cada una de ellas, se muestran los datos ± desviación estándar

La determinación del contenido de lectina en la hemolinfa de los diferentes estadios se realizó también por ELISA, de la siguiente manera: en placas de micro titulación de poliestireno (Nunc), se fijó la hemolinfa en amortiguador de carbonatos 0.1 M, (pH 9.6, dilución 1:80) 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, después de cinco lavadas con PBS-T, se bloquearon los pozos con leche descremada al 5% en PBS 90 min a 37°C y se repitió el lavado, se incubaron 90 min a 37°C con el anticuerpo monoclonal acoplado a peroxidasa (1:400), las

placas se lavaron 6 veces con PBS-T y la reacción se reveló incubando la placa con 100 μ l del sustrato (OPD 0.04 % y H₂O₂ 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5) a temperatura ambiente en oscuridad (como máximo 30 min), la reacción se detuvo añadiendo 100 μ l de HCl 3N, finalmente las placas se leyeron a 492 nm en un lector de ELISA. Para calcular la concentración de la lectina se interpolaron los valores de D.O. en la curva estándar.

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE

Se determinó la actividad aglutinante de la hemolinfa del langostino en los diferentes estadios por doble dilución seriada, en presencia de eritrocitos de diferentes especies animales de la siguiente manera: en placas de microtitulación con fondo en "U" se colocaron, a cada pozo, 25 μ l de PBS y se agregaron 25 μ l de la lectina o hemolinfa, diluyéndolo de forma seriada, posteriormente se agregaron 25 μ l de eritrocitos al 2% en PBS, se incubó por 2h a temperatura ambiente y se tomó la lectura por observación directa.

Los eritrocitos humanos (grupos sanguíneos A, B y O) fueron obtenidos de donadores sanos, los eritrocitos animales de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, México. Las muestras sanguíneas se colectaron en citrato de sodio 3%-PBS p/v, los eritrocitos se lavaron tres veces con PBS y se centrifugaron a 300 g por 5 minutos antes de usarse. Los resultados son representados como la actividad específica (título de hemaglutinación/concentración de proteína), de acuerdo al método descrito por Vázquez *et al.* (1993).

RESULTADOS

Langostinos

De acuerdo a los estadios de maduración del langostino se agruparon en cuatro estadios de crecimiento: Juvenil I (post-larva), animales con 7 ± 0.5 cm de longitud, peso promedio de 2.33 ± 0.7 g, cuerpo translucido sin quelas desarrolladas; Juvenil II de 9.1 ± 0.8 cm, peso 5.7 ± 0.5 g, cuerpo no translucido y quelas sin desarrollar aún; Adulto I especímenes de intermuda de 10.3 ± 0.9 cm, peso de 13.2 ± 1.5 g, quelas en desarrollo y Adulto II 11.9 ± 1 cm de longitud, cuerpo translucido exoesqueleto completo y peso promedio de 17.3 ± 4 g. Se obtuvo la hemolinfa de los cuatro diferentes estadios de desarrollo del animal y se guardó a -70°C hasta su posterior utilización.

Purificación de lectina

Como se puede apreciar en la Figura 2 y la Tabla 3, la purificación se realizó utilizando como matriz de afinidad estroma de rata tratada con glutaraldehído, la lectina fue eluida con ácido acético al 3%. Se logró purificar 0.014 mg de proteína por cada 100 mg de proteína de la hemolinfa; con este procedimiento se obtuvo un incremento en la actividad específica, así de 12.8 UHA/mg que tenía la hemolinfa, la lectina pura presentó 45 714 UHA/mg, lo que representa un incremento de 3 246 veces la actividad específica de la lectina con respecto al suero. La fracción no retenida no posee actividad aglutinante.

Anticuerpos monoclonales

Se inmunizaron ratones BALB/c con la lectina MrL, los ratones que presentaron el mejor título en ELISA (Figura 3), se utilizaron para la fusión con células de mieloma. De las placas de fusión, se seleccionaron los sobrenadantes de los pozos con mejores títulos para la lectina MrL por ELISA y se clonaron y reclonaron, ver Figura 4. El título de las clonas contra la lectina MrL, incluida la seleccionada (1F9), esta en la Figura 5. De la cuarta clonación, se procedió a

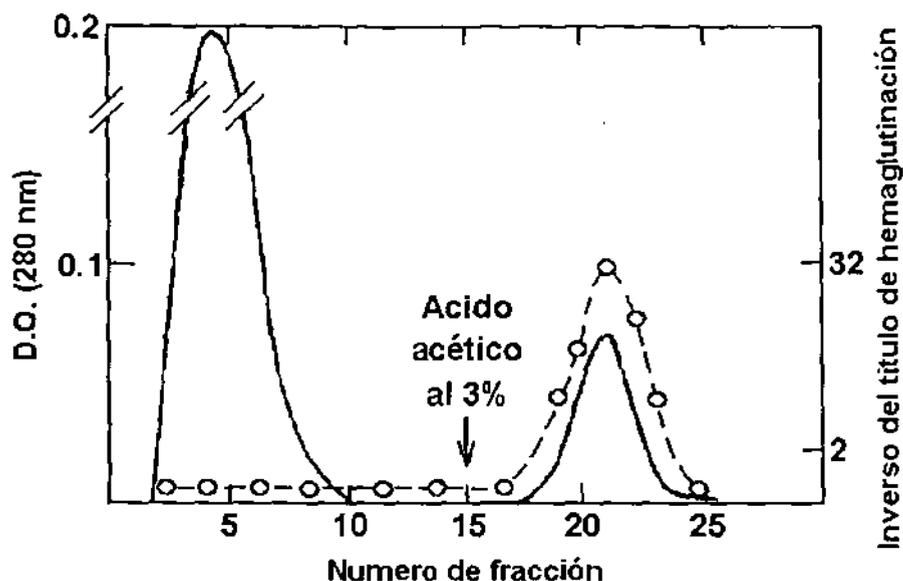


Figura 2. Patrón de elución de lectina MrL de hemolinfa de organismos adultos. Por cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos de rata-Sephadex G-25. Se aplicaron 400 μ l de hemolinfa a la columna previamente equilibrada con TBS pH 7.4 con un flujo de 10 ml/h. La columna se lavó con TBS para eliminar el material y la lectina se eluyó con ácido acético al 3%. A cada fracción de 1.5 ml, se le determinó absorbancia a 280 nm y actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de rata al 2 % en TBS (— D.O. de la fracción, —○—○— Inverso del título de hamaglutinación).

Tabla 3. Proceso de purificación de la lectina de *M. rosenbergii*, en estroma de eritrocitos de rata (a partir de 1 ml de hemolinfa).

Fracción	Proteína Total (mg)	UHA*	Actividad Especifica (UHA/mg) ¹
Hemolinfa	100	1280	12.8
Fracción NR	87	0	0
Lectina	0.014	640	45,714

*Unidades hemaglutinantes en presencia de una solución al 2% de eritrocitos de rata. ¹ Actividad Especifica = UHA/mg de proteína.

analizar el isotipo de cada una de ellas, por medio de ELISA con un kit comercial. El anticuerpo seleccionado (1F9), presentó isotipo IgG3 κ (Tabla 4).

Se seleccionó la clona 1F9 para la producción de líquido de ascitis, por lo que se inyectaron células con pristano intraperitonealmente a ratones BALB/c hembras a fin de expandirla, obtener líquido de ascitis y tener mayores cantidades del anticuerpo monoclonal, se obtuvo suficiente material para purificarlo y aplicarlo en la posterior caracterización de la lectina, el material se almacenó a -20°C hasta su posterior uso.

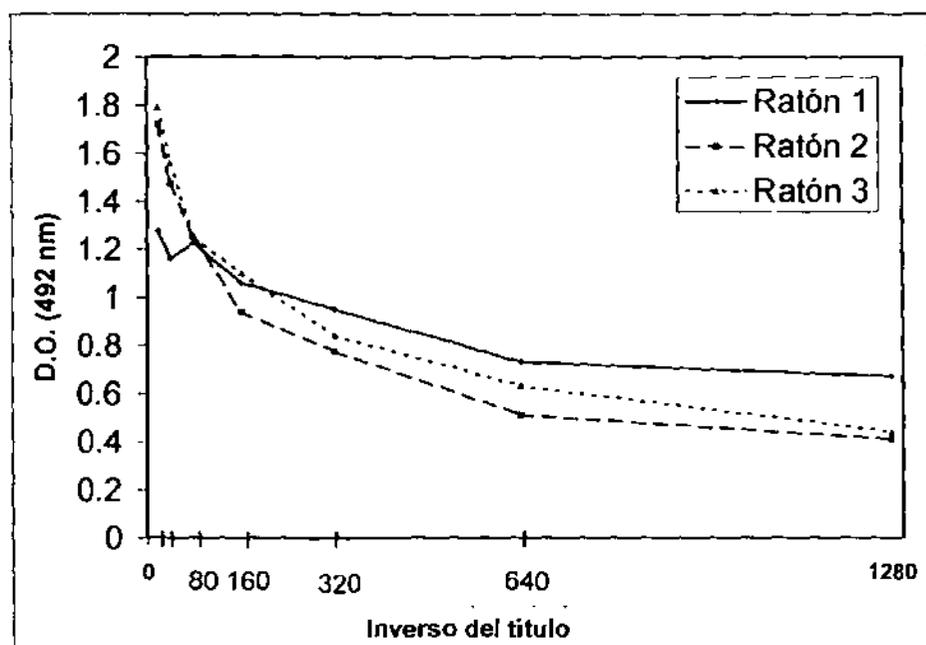


Figura 3. ELISA de ratones de fusión. Se realizó la titulación de los sueros de los ratones inmunizados con la lectina MrL, la lectina se fijó a la placa de poliestireno con amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.5, se agregó anticuerpo anti ratón diluido 1:1000. La reacción se reveló con OPD y H_2O_2 en amortiguador de citratos 100 mM, pH 5 y se leyó a 492 nm en un lector de ELISA y el ratón 1, que presentó el mayor título, se seleccionó para la fusión celular.

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS

La purificación de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo en dos fases, en la primera se precipitaron con sulfato de amonio saturado y después de una diálisis exhaustiva se purificaron por intercambio iónico.

Figura 4: Esquema de clonación de los híbridos obtenidos. En color oscuro se marca la clona seleccionada para la siguiente clonación.

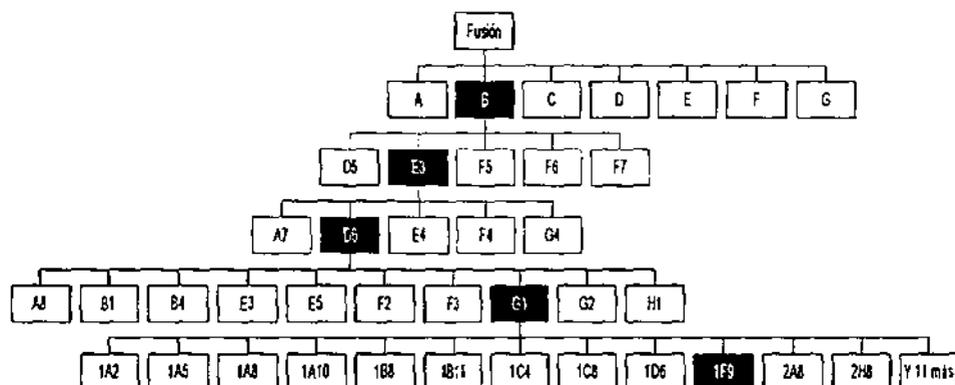


Tabla 4. Isotipo de clonas provenientes de BE3D6G1.

Clona	Cadena pesada	Cadena ligera
1A10	IgM	κ
1B8	IgM	κ
1C4	IgA	λ
1C8	IgG1	κ
1F9	IgG3	κ
2A8	IgG3	κ
2H8	IgM	κ
Varios Isotipos: 1H10, 1E10, 2B12, 2D9, 1A2, 2D7, 1A8, 1G5, 2E12, 2F3, 2F10, 2H2		

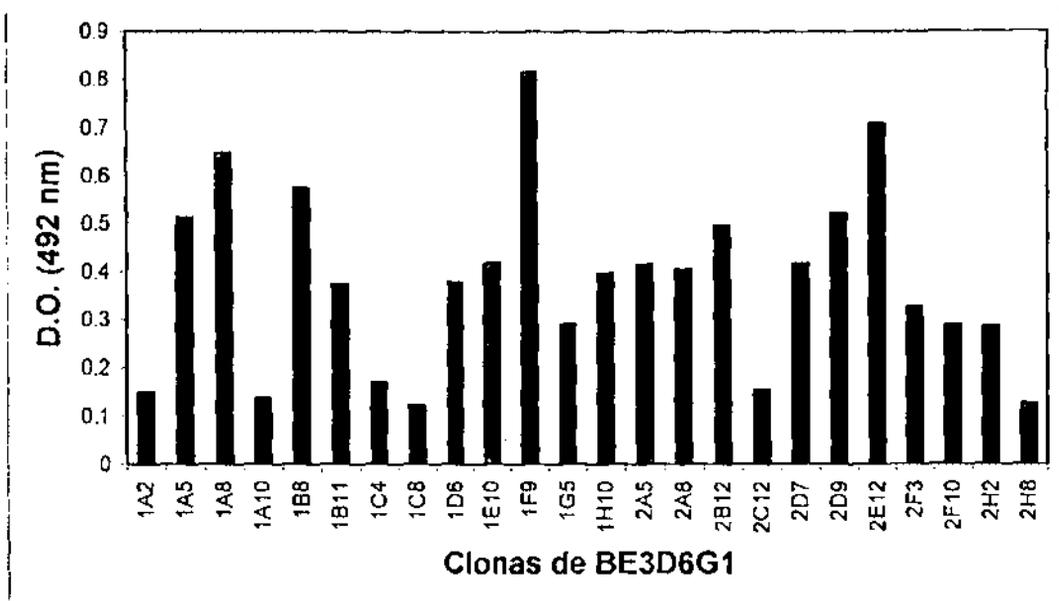


Figura 5. ELISA a partir de híbridos BE3D6G1, contra MrL. Se realizó la ELISA de la última clonación, la lectina se fijó a la placa de poliestireno con amortiguador de carbonatos 0.1M, pH 9.5, se agregó sobrenadante de cultivo con Mab y anticuerpo anti ratón diluido 1:1000. La reacción se reveló con OPD y H₂O₂ en amortiguador de citratos 100 mM, pH 5.6 y se leyó a 492 nm en un lector de ELISA. Se seleccionó el híbrido 1F9 por presentar la mayor reactividad contra el antígeno.

Purificación de anticuerpos monoclonales 1F9 en DEAE-Sephadex

Para la separación de los anticuerpos en DEAE-Sephadex, se utilizó un gradiente discontinuo de 0 a 0.5 M de NaCl con aumento constante del eluyente. Se recuperó el 29% de la proteína que ingresó a la matriz y se analizaron las fracciones por SDS-PAGE. No se observó una gran cantidad de anticuerpo en las fracciones recuperadas (Figura 6), la purificación de anticuerpos fue parcial (Figura 7), las fracciones que contenían al anticuerpo eluyeron a 100 y 150 mM de NaCl respectivamente.

Purificación de anticuerpos monoclonales 1F9 en Mono Q

La purificación de anticuerpos monoclonales por intercambio iónico se realizó en una columna aniónica Mono Q utilizando anticuerpos precipitados en sulfato de amonio saturado. La elución se realizó en un gradiente lineal de 0 a 0.35 M de NaCl en el amortiguador inicial, el gradiente se realizó en 25 min. La purificación realizada con el anticuerpo monoclonal 1F9, presentó cuatro fracciones (Figura 8), las cuales al analizarlas en SDS-PAGE, se observó en la segunda fracción, las bandas correspondientes al anticuerpo monoclonal, esta fracción eluyó a 0.15 M de NaCl y se recuperó el 92% de proteína que se aplicó a la columna. Aún cuando este método de purificación presentó un mejor rendimiento y una mayor pureza, la fracción con el anticuerpo se sometió a un segundo proceso de cromatografía, para asegurar su pureza y se observó una mejor separación del anticuerpo (Figuras 9 y 10).

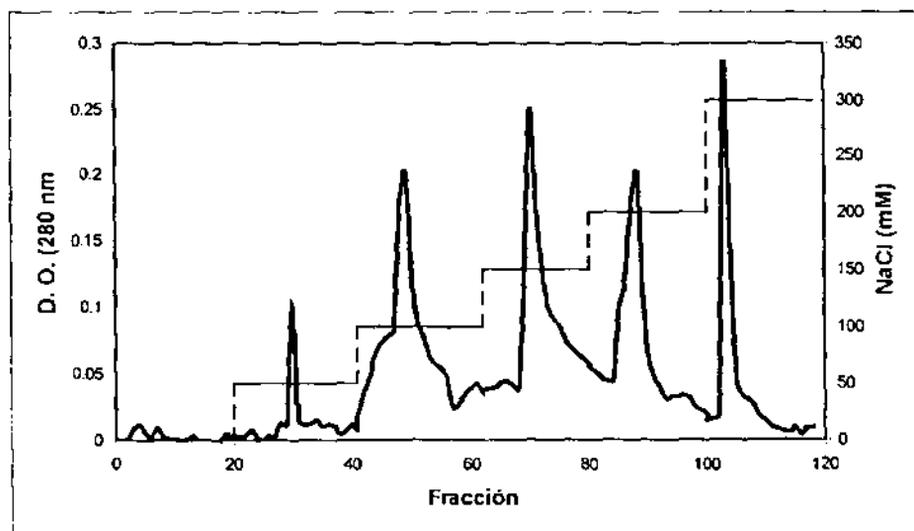


Figura 6. Patrón de elución de Mab 1F9 en columna de DEAE-Sephadex. Se aplicó 1 ml (5 mg) de anticuerpos a la columna, se lavó con tris 10 mM, pH 8.5. Se eluyó con NaCl y cada fracción se leyó a 280 nm en espectrofotómetro (— D.O. de la fracción, ---Gradiente de elución).

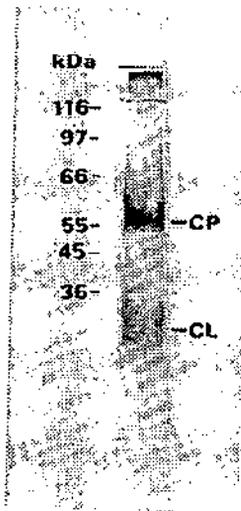


Figura 7. Electroforesis del Mab 1F9, purificada en DEAE-Sephadex. La electroforesis de los anticuerpos se realizó en geles de poliacrilamida al 10 % con SDS en condiciones de reducción, la migración electroforética se realizó con 100 V, en amortiguador de corrida pH 8.3 (CP cadenas pesada, CL cadena ligera).

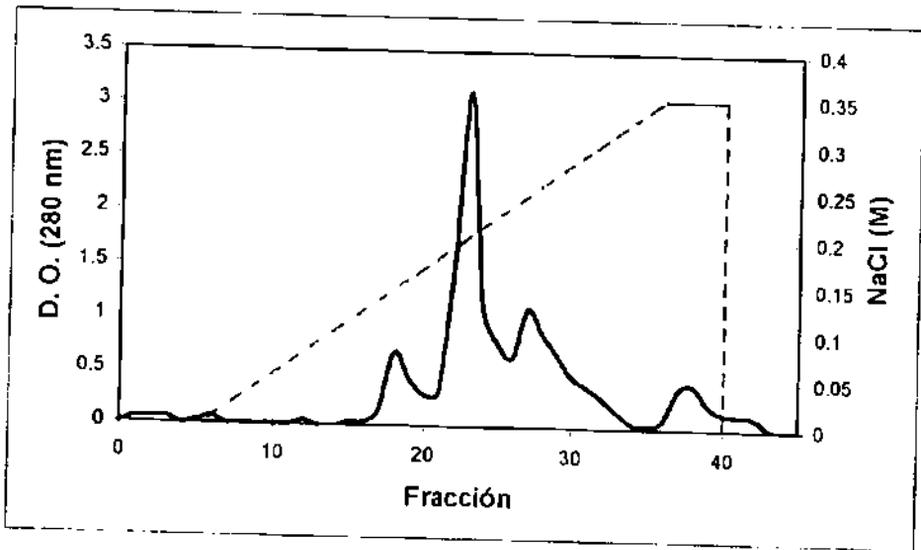


Figura 8. Patrón de elución de Mab 1F9 en columna Mono Q. Se aplicó 0.5 ml (1 ó 5 mg) de anticuerpos a la columna, se lavó con TEA 20 mM, pH 8.5. Se eluyó con un gradiente de NaCl de 0-0.35 M y cada fracción se leyó a 280 nm en espectrofotómetro (— D.O. de cada fracción, ---Gradiente de elución).

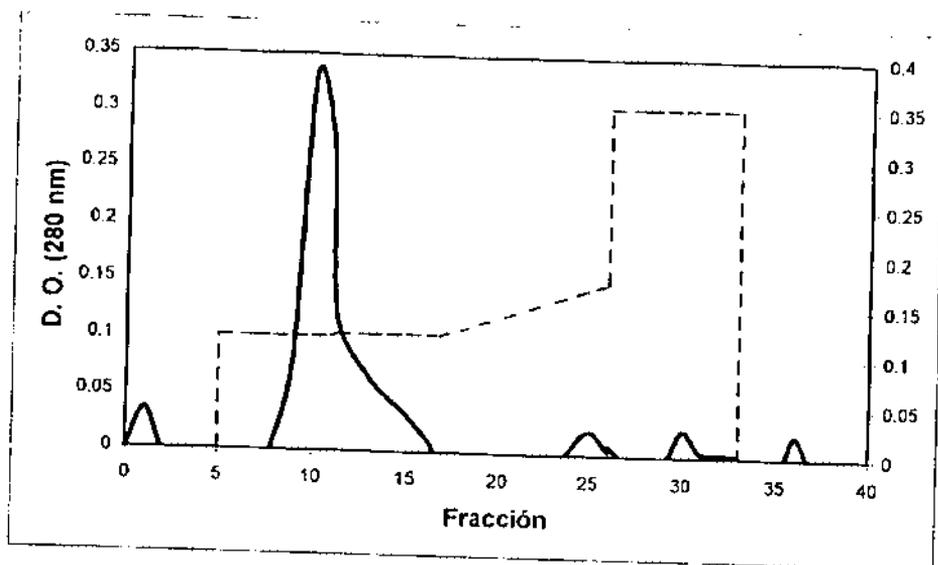


Figura 9. Patrón de elución de la segunda fracción en columna Mono Q. Se aplicó la fracción conteniendo Mab de la purificación anterior a la columna, se lavó con TEA 20 mM, pH 8.5. Se eluyó con un gradiente de NaCl de 0-0.35M y cada fracción se leyó a 280 nm en espectrofotómetro (— D.O. de cada fracción, — Gradiente de elución).

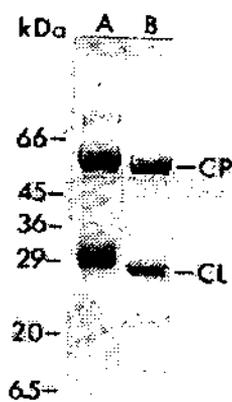


Figura 10. SDS-PAGE del Mab 1F9, purificada en columna Mono Q en FPLC. La electroforesis de los anticuerpos se realizó geles de poliacrilamida al 10 % con SDS en condiciones de reducción, la migración electroforética se realizó con 100 V, en amortiguador de corrida pH 8.3. A. Fracción purificada a partir de anticuerpos precipitados con sulfato de amonio, primer cromatografía. B. Fracción purificada a partir de columna Mono Q segunda cromatografía (CP cadenas pesada, CL cadena ligera)

CARACTERIZACIÓN Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA.

La lectina purificada del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, es una glicoproteína con peso molecular de 19 kDa formada por 2 subunidades de 9.6 kDa, determinada por electroforesis (Figura 11). Los aminoácidos más abundantes son glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico, es pobre en metionina e histidina (Tabla 5); contiene un 11% de azúcares, entre ellos contiene NeuAc, galactosa, manosa y GlcNAc (Tabla 6).

Determinación del peso molecular

La determinación del peso molecular de la lectina se realizó en SDS-PAGE y se observó que la fracción purificada es homogénea, con peso molecular de 9.6 kDa. Por inmunoelectrotransferencia, usando anticuerpos monoclonales, se observó solo una banda de reconocimiento (Figura 11).



Figura 11. Inmunoelectrotransferencia de la lectina. Se realizó la electroforesis de 0.1 μ g de lectina, tratada con β -MSH y SDS, geles de poliacrilamida al 10 % con SDS en condiciones de reducción, la migración electroforética se realizó con 100 V, en amortiguador de corrida pH 8.3. Se transfirió a papel de nitrocelulosa, para revelar se empleo el Mab 1F9 acoplado a peroxidasa.

Tabla 5. Composición de aminoácidos de la lectina purificada de *M. rosenbergii*.

Aminoácido*	M (%)	Aminoácido*	M (%)
Gly	17	Lys	5
Ser	13	Arg	3
Glx	13	Pro	3
Asx	10	Phe	3
Ala	9	Hys	3
Leu	4	Tyr	3
Val	5	Met	1
Thr	5	½ Cys	1

* Basado en peso molecular de 19 000 daltons.

Tabla 6. Composición de carbohidratos de la lectina purificada de *M. rosenbergii*.

Carbohidrato	No de residuos/mol
NeuAc	5
Gal	4
Man	3
GlcNAc	3
GalNAc	1

* Basado en peso molecular de 19 000 daltons.

Determinación del contenido de lectina en diferentes estadios del langostino *M. rosenbergii*.

Se estandarizó la curva de reconocimiento de lectina por el método de ELISA, (lectina de organismos en estadios Juvenil I y Adulto I, Figura 12), se usaron concentraciones crecientes de la lectina en la placa de ELISA, se usó el anticuerpo monoclonal 1F9 acoplado a peroxidasa, la sensibilidad de la prueba permitió detectar concentraciones de lectina de 30 ng/ml (1.5 fmol).

La determinación de la cantidad de lectina presente en la hemolinfa en los diferentes estadios se realizó por ELISA interpolando las D.O. de cada estadio en

la curva estándar, se presentaron los siguientes resultados: Etapa Juvenil I presentó la mayor concentración de lectina con 2.6 ± 0.4 mg/ml, representando el 1.5% de proteína total presente en la hemolinfa. Etapa Juvenil II tiene menor concentración de lectina que la etapa anterior, con 1.8 ± 0.3 mg/ml (0.7% de proteína total). Adulto I y Adulto II poseen cantidades promedio de lectina con 1.9 ± 0.4 mg/ml y 1.5 ± 0.7 mg/ml respectivamente, lo que representa 0.7% y 0.5% del total de la proteína circulante en el organismo (Tabla 7).

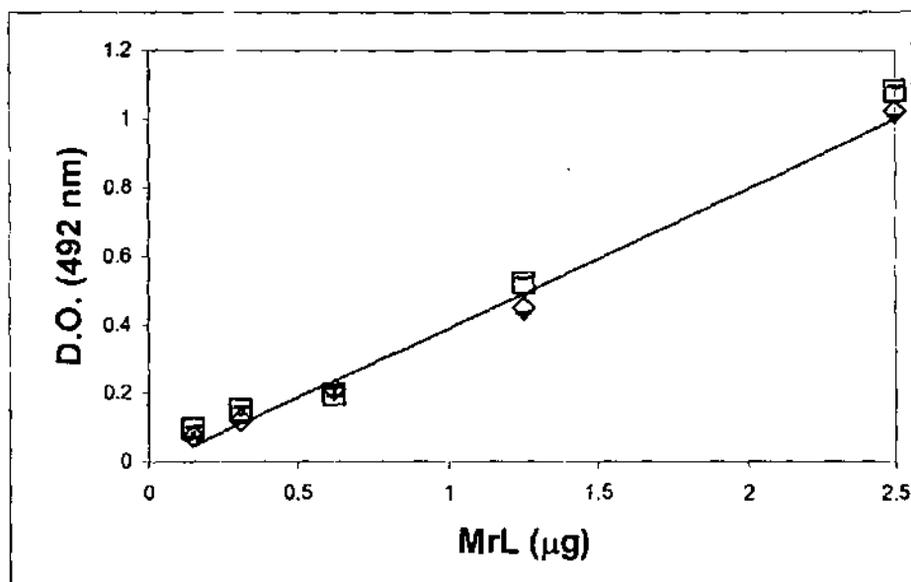


Figura 12. Curva estándar de la lectina MrL en ELISA. El eje x representa la cantidad de MrL adicionada a los pozos, de los langostinos adulto (◇) y juvenil (□). La prueba se realizó por triplicado y los resultados representan el promedio de las determinaciones. Se muestran los datos \pm desviación estándar.

Actividad hemaglutinante

La actividad hemaglutinante de la hemolinfa de las diferentes etapas de desarrollo del langostino se realizó usando eritrocitos humanos tipo A, B y O, de

Tabla 7. Determinación de la concentración de lectina por ELISA, en la hemolinfa de *M. rosenbergii* en diferentes estadios de maduración.

Estado de maduración	Proteína (mg/ml)	Lectina (mg/ml)	% de lectina en suero
Juvenil I	166±9	2.6±0.3	1.5
Juvenil II	240±11	1.8±0.3	0.7
Adulto I (Intermuda)	266±14	1.9±0.4	0.7
Adulto II (Muda)	288±15	1.5±0.2	0.5

ratón, rata, gato, pollo, conejo y oveja. Como se observa en la tabla 8, la actividad aglutinante de hemolinfa de los diferentes estadios, se observó únicamente en eritrocitos de rata, conejo y pollo. El mayor título de aglutinación se observó en organismos adultos I y II con eritrocitos de rata (17.4 y 19.6 respectivamente), de conejo (15.8 y 16.5 respectivamente) y de pollo (13.2 y 14.1 respectivamente). El mayor título de hemaglutinación se dió en la hemolinfa de adultos en estado de intermuda (Adulto I; 19.6 con eritrocitos de rata, 16.5 de conejo y 14.1 de pollo); el título de los organismos Adulto I fue tres veces mayor en presencia de eritrocitos de rata y conejo, y cuatro veces mayor en presencia de eritrocitos de pollo, que la hemolinfa de especímenes postlarva (Juveniles I).

Se identificó la especificidad de la lectina por azúcares, glicoproteínas o sus derivados desialilados en ensayos de inhibición de la hemaglutinación y se observó que la actividad hemaglutinante se inhibió con azúcares N-acetilados en todos los estadios: GlcNAc, GalNAc y NeuAc, aunque los organismos juveniles necesitaron una mayor concentración de azúcares para inhibir su actividad (Tabla 9), para GlcNAc y GalNAc necesitaron 4 veces más que los adultos y para NeuAc 4.2 veces más. De las proteínas utilizadas, la fetuina es la que mostró ser el inhibidor más potente, y las demás proteínas inhibieron en menor cantidad (IgA, mucina submaxilar bovina y porcina), aunque en proporciones parecidas para juveniles y adultos.

Tabla 8. Actividad hemaglutinante de la hemolinfa de *M. rosenbergii* obtenida en diferentes estadios de maduración.

Eritrocito	Juvenil		Adulto	
	I	II	I	II
Humano A	SA	SA	SA	SA
Humano B	SA	SA	SA	SA
Humano O	SA	SA	SA	SA
Rata	6.5	8.2	17.4	19.6
Ratón (BALB/c)	SA	SA	SA	SA
Gato	SA	SA	SA	SA
Pollo	2.4	4.1	13.2	14.1
Oveja	SA	SA	SA	SA
Conejo	5.1	7.8	15.8	16.5

Los resultados están representados como la actividad específica, que representa el título de hemaglutinación total/concentración de proteínas (mg/ml). SA= sin actividad.

Tabla 9. Concentraciones mínimas (μM) de azúcares y glicoproteínas capaces de inhibir la actividad hemaglutinante de hemolinfa de *M. rosenbergii* obtenida en diferentes estadios de maduración.

Compuesto	Juvenil		Adulto	
	I	II	I	II
NeuGc	200	200	200	200
GlcNAc	100	100	25	25
GalNAc	100	100	25	25
NeuAc	50	50	12	12
IgA	0.5	0.5	0.6	0.6
Fetaina	0.001	0.002	0.002	0.002
Mucina submaxilar ovina	0.1	0.1	0.1	0.1
Mucina submaxilar bovina	0.05	0.05	0.05	0.05

Concentraciones mínimas requeridas para inhibir 4 unidades de hemaglutinación de la hemolinfa en presencia de eritrocitos de rata.

DISCUSION

La primer línea de defensa en invertebrados contra organismos potencialmente invasivos, son las defensas del tegumento o del intestino medio, que incluyen proteínas citotóxicas y péptidos antimicrobianos sintetizados por las células epidérmicas y que son transportadas al sitio de lesión. Los organismos extraños que logran atravesar las barreras tegumentarias, pasan a través de la pared intestinal, invaden el hemocele, donde células sanguíneas reactivas ahí presentes (hemocitos, coelomocitos) inducen la producción de moléculas citotóxicas específicas e inespecíficas, que se encargaran de la destrucción del agente invasor. Las respuestas celulares inmune predominantes en insectos son la encapsulación y la fagocitosis con la participación de lectinas como opsoninas. La respuesta secundaria, dirigida contra organismos eucariontes, implica la intervención de numerosos hemocitos, en un tipo de "fagocitosis comunal" que aísla parásitos envolviéndolos en varias capas de células. En artrópodos, los componentes celulares de la cápsula, típicamente están melanizados. La inmunidad humoral contra invasiones en el hemocele implica la inducción de cascadas proteolíticas que causan la coagulación de la hemolinfa, (actividad análoga a la activación de la vía alterna del complemento en procordados y equinodermos), reacciones localizadas de melanización, la generación de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno y mecanismos independientes de oxígeno, que incluyen la síntesis de lisozima, enzimas hidrolíticas y proteolíticas y péptidos antimicrobianos (Soderhall, 1984, Vázquez, *et al.* 1998). La respuesta inmune en crustáceos consta por un lado de factores humorales, donde se incluyen la activación de sistemas multienzimáticos, como el sistema de la proPO, síntesis de factores séricos con actividad antibacteriana y la formación de nódulos y por otro lado, la actividad celular encargada de eliminar microorganismos. La actividad fagocítica la realizan los hemocitos circulantes, que intervienen en varios procesos. Estas células actúan de forma específica atacando constituyentes comunes a varios tipos de patógenos, sin embargo se ha reportado que estas células carecen de memoria ante el organismo que lo infecta y por otro lado no se ha reportado que factores son los que regulan estas actividades. A través de

numerosos estudios ha sido un paralelismo sorprendente entre la respuesta inmune de artrópodos y mamíferos (Rinkevich, 1999). Este paralelismo indica que el sistema inmune innato de vertebrados e invertebrados podría tener un ancestro común. Por otra parte, en invertebrados no existe evidencia de respuesta inmune adquirida, aunque es necesario considerar que los invertebrados poseen un repertorio limitado de células circulantes que realizan diversas actividades como transporte y defensa.

Tradicionalmente, se ha considerado la hipótesis de que las lectinas son proteínas que si bien no son producidas como respuesta a un estímulo antigénico, se les atribuyen otras funciones biológicas, entre ellas el transporte de azúcares y glicoconjugados, pero su(s) función(es) aun no se definen con precisión. En artrópodos, se ha sugerido que tienen un papel importante en los mecanismos de defensa, por ejemplo, se ha propuesto que la lectina MrL de *M. rosenbergii*, participa en el reconocimiento de lo propio y lo extraño, dado que aglutina bacterias con determinantes polisacáridicos similares en *Pasteurella haemolytica* serotipo A (serotipo capsular 12), *Bacillus cereus* y *Aeromona sp.* y en menor proporción *Escherichia coli* y *Salmonella arizona* (Vázquez, et al. 1994 y 1996). Otro ejemplo es la lectina del cangrejo *Carcinoscorpius rotunda cauda*, que reconoce bacterias y lipopolisacáridos (Dorai et al. 1982). También se ha propuesto su función como opsoninas en la respuesta humoral (Vasta et al. 1994; Vázquez, et al. 1998).

Una observación interesante es el hecho de que el langostino *M. rosenbergii* es una especie fácilmente adaptable a condiciones de cultivo, intensivo y extensivo, sin embargo en las primeras etapas de vida del organismo, presenta una alta mortalidad, lo que nos hace suponer que esta fallando algún mecanismo de defensa, presente en esos primeros estadios. Los estudios realizados sobre la lectina de este langostino se han efectuado con la lectina obtenida de la hemolinfa del animal adulto (Vázquez, et al. 1993, 1994, 1996 y 1997; Sierra et al. 1998). Así, pareció trascendental identificar y caracterizar a la lectina en adulto y cuantificarla en los diferentes estadios de maduración del langostino a fin de contar con un procedimiento cuantitativo de detección de

lectina, y eventualmente poder asociar la cantidad y calidad de la lectina con posibles estados de inmunosupresión, contaminación, alimentación, estrés etc.

La lectina se purificó por cromatografía de afinidad en una columna conteniendo estroma de rata, con lo cual se aumentó la actividad específica de la lectina, así de 12.8 UHA/mg que tenía la hemolinfa, la lectina pura presentó 45,714 UHA/mg, lo que representa un incremento de 3, 571 veces la actividad específica de la lectina con respecto a la hemolinfa.

En general las lectinas son un grupo de moléculas heterogéneas en su peso molecular, con una gran diversidad estructural. En animales el rango de peso molecular varía de 14 a 1,600 kDa (Lis & Sharon, 1998; Varki *et al.* 1999), en crustáceos, se han reportado lectinas como la de *Liocarcinus depurator* de 700 kDa con subunidades de 38 kDa (Fragkiadakis & Stratakis, 1997) hasta la lectina de *M. rosenbergii*, de 19 kDa con subunidades de 9.6 kDa (Vázquez *et al.* 1993). La especificidad de las lectinas es muy amplia, reconocen desde azúcares simples hasta azúcares en estructuras complejas, tanto proteicas como lipídicas. Pueden reconocer D-azúcares, en algunos casos azúcares N-acetilados (NeuAc, GlcNAc y GalNAc), como la mayoría de crustáceos decápodos (Tabla 1). Otras lectinas tienen especificidad por alguna variedad de ácido siálico, por ejemplo, la lectina de *C. antennarius* (Ravindranath *et al.* 1985) mostró especificidad por ácido 9-O/4-O acetilsialico.

La caracterización de la lectina nos indica que es una glicoproteína, con un contenido de 11% de azúcares, y un peso molecular de 19 kDa, los aminoácidos más abundantes en la parte proteica son: glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico, y en menor proporción se encuentran metionina e histidina. La parte sacarídica está compuesta por NeuAc, galactosa, manosa y GlcNAc. Esta lectina es de bajo peso molecular comparada con las demás lectinas de crustáceos decápodos, y al igual que ellas tiene especificidad por azúcares N acetilados y por ácido siálico (Tablas 1, 3, 4).

La participación del ácido siálico se ha puesto de manifiesto en procesos malignos, por ejemplo ciertos tipos de cáncer (Singhal & Hakomori, 1990), con el uso de MAb, con especificidad por ácido siálico, demuestran un aumento de

glicoproteínas cancerígenas conteniendo éste azúcar. Otro ejemplo es la enfermedad de Alzheimer donde se han observado patrones de glicosilación aberrantes (Guevara *et al.* 1998), lo demostraron con el uso de lectinas, entre ellas la lectina del langostino, de ello se puede concluir que la lectina del langostino tiene aplicación en el diagnóstico de la enfermedad y potencialmente podría usarse en el diagnóstico de otras enfermedades en las que se incremente la cantidad de ácido siálico en las proteínas, de superficie o solubles.

La obtención de anticuerpos monoclonales contra la lectina soluble MrL presenta algunas ventajas sobre los anticuerpos policlonales como la posibilidad de obtener indefinidamente el anticuerpo sin más estimulación antigénica, la obtención homogénea de anticuerpos de un solo isotipo con reconocimiento a un solo epítipo del antígeno con el que fue estimulado (una especificidad), además de que potencialmente pueden emplearse con diversos fines.

La obtención de MAb tiene múltiples aplicaciones en la caracterización de la lectina y en este trabajo se emplearon para cuantificar el contenido de lectina presente en la hemolinfa de los diversos estadios de vida del langostino. Posterior a la fusión celular, se obtuvieron varias clonas, se trabajó con la que presentó mayor título hacia la lectina MrL (clona B), para asegurar la monoclonalidad del hibridoma, se realizaron 4 clonaciones sucesivas (Figura 3). Las clonas 1A8, 1B10, 1F9 y 2E12 son las que presentaron el mejor reconocimiento por la lectina (Figura 4), otras clonas presentaron un solo isotipo (Tabla 5). La clona 1F9 que presentó el mayor título por la lectina MrL, con isotipo IgG3 κ , fue seleccionada para continuar trabajándola, por lo que fue expandida en ratón y se obtuvo líquido de ascitis.

El anticuerpo monoclonal seleccionado 1F9 se acopló a peroxidasa y este conjugado se utilizó para cuantificar el contenido de lectina presente en la hemolinfa de cuatro estadios de desarrollo del langostino. El método de ELISA estandarizado para este propósito resultó altamente sensible ya que detectó 30 ng de lectina/ml (1.5 fmol, Figura 14).

La cuantificación de las lectinas en diferentes estadios es un estudio nuevo en invertebrados, hasta el momento solo existe otro reporte que indica variaciones

de lectina en *Pieris brassicae*, (Mauchamp & Hubert, 1984), donde encontraron variaciones de la lectina en la muda entre dos estadios de desarrollo, esto concuerda con nuestros resultados, ya que también encontramos variaciones en los diferentes estadios de desarrollo: en la etapa de Juvenil I se presentó el 1.5% de lectina, de la proteína total presente en la hemolinfa. La etapa Juvenil II tiene 53% menos concentración de lectina con respecto a la etapa de Juvenil I. Los especímenes Adulto I y Adulto II poseen, respectivamente, 53% y 66% menos concentración de lectina que la etapa Juvenil I. Con nuestros resultados consideramos que el estadio de desarrollo del langostino regula la función de la lectina y por ello encontramos variación en la cantidad de lectina entre los estadios.

El conocimiento de la inmunidad en crustáceos de uso alimenticio, esta principalmente enfocada a camarones, incluye factores ambientales y control de enfermedades (Bachere, 2000; Le Moullac & Haffner, 2000), sin embargo, es poco el conocimiento que se tiene de proteínas que intervengan en el sistema inmune. Actualmente se están realizando una gran cantidad de trabajos relacionados con diversos efectos en crustáceos de uso alimenticio en el sistema inmune, incluido el langostino *M. rosenbergii*, tales como contaminantes (Cavalli *et al.*, 2000; Chen & Lee, 1997; Law & Yeo, 1997; Lombardi *et al.* 2000), factores ambientales (Cheng & Chen 2000), inducción de infecciones por virus y bacterias (Cheng & Chen 1998a, 1998b; Peng *et al.* 1998; Sahul *et al.* 2000; Sung *et al.* 2000; Vici *et al.* 2000), efectos de alimentación y vitaminas (Dandapat *et al.* 2000), todos ellos en función del sistema de defensa. Sin embargo, los parámetros usados para evaluar dichos efectos, están relacionados con tasas de mortalidad, aumento de peso o aumento en la activación de sistemas complejos, (como el de la proPO), y ninguno de ellos centra su atención en moléculas que pudieran estar involucradas con el sistema inmune del organismo, por ello podemos proponer el sistema estandarizado de ELISA, que realizamos en este trabajo, para evaluar el posible efecto que tengan algunos de estos factores en el sistema inmune del organismo, en particular del langostino *M. rosenbergii*, por ejemplo, consideramos que la lectina al tener funciones de opsonina en el sistema inmune del langostino, se

puede evaluar el posible efecto protector que tenga al inducir la infección por *Aeromonas sp.*, analizando por ELISA la variación de lectina que se pudiera presentar, a concentraciones que no causan mortalidad en el organismo.

La capacidad de aglutinación de la lectina por diferentes eritrocitos (de rata, conejo y pollo), observada en los estadios de maduración analizados y la especificidad por ácido siálico y azúcares N-acetilados se conservó, indicando que la especificidad de la lectina no es alterada por el estadio de desarrollo del langostino, por ende es de suponer que el sitio de enlace a carbohidratos en estas proteínas se conserva durante la maduración.

En vertebrados, las lectinas tienen funciones específicas en la inmunidad del organismo, por ejemplo, la MBL activa la cascada del complemento de manera específica por los azúcares que reconoce, las selectinas (CD62, P, L, S), funcionan como moléculas de adhesión a células endoteliales o el CD94, que es un inhibidor de células NK (Vasta *et al.* 1994; Varki *et al.* 1999). Sin embargo en invertebrados solo se especula sobre sus funciones reales, entre las que incluimos la opsonización, activación del sistema del complemento primitivo (vía de las lectinas) en equinodermos y procordados (Gross *et al.* 1999), activando el sistema de proPO con la correspondiente activación de la melanización (Nappi & Ottaviani, 2000).

La lectina MrL tiene un 54% de homología con una hormona hiperglicemiante de langostino (Zenteno *et al.* 2000), nuestra observación de la necesidad de usar mayor concentración de azúcares para inhibir su función aglutinante en organismos juveniles, que en adultos, sugiere que la lectina es requerida en funciones de transporte de azúcares (GlcNAc), en el estadio Juvenil I de este crustáceo, ya que en esa etapa se requiere el movimiento constante de GlcNAc para la formación del exoesqueleto del langostino, compuesto por polímeros de este azúcar, aunque no existe otra evidencia aún para explicar porque la lectina sérica de animales jóvenes muestra una menor actividad aglutinante que la de adultos, a pesar que la concentración de lectina es mayor en el estado juvenil.

Reportes previos indican que los hemocitos circulantes son el sitio de síntesis de la lectina, ya que estudios ultraestructurales realizados con anticuerpos policlonales dirigidos contra la lectina purificada (MrL) permite identificar a la lectina en el complejo de Golgi, en gránulos de secreción y en la membrana plasmática (Sierra *et al.* 1998). La lectina se encuentra asociada con componentes de membrana celular de granulocitos de 68 y 72 kDa (Vázquez *et al.* 1997). La lectina aislada de hemolinfa, por otro lado, podría tener funciones en el sistema inmune del crustáceo en el reconocimiento de material extraño, debido a la capacidad de la lectina por reconocer grupos O-ceto y O-metilo, presentes en la superficie de bacterias patógenas a invertebrados, tales como *Aeromonas* y de *Bacillus cereus* (Vázquez *et al.* 1996), así la lectina participaría en el mecanismo de defensa o como opsonina en la fagocitosis de material extraño al langostino, y posiblemente algún proceso de la regulación endocrina del organismo podría modificar también la función de la lectina. Estos datos, además de la homología que presenta con cadenas κ y λ de las inmunoglobulinas humanas (22% y 27% respectivamente), sugiere su posible función como anticuerpos primitivos, dada su actividad opsonizante y aglutinante de bacterias (Zenteno *et al.* 2000). Los resultados presentados nos permiten proponer que la lectina de membrana presente en algunos hemocitos circulantes del langostino podrían funcionar en forma semejante a componentes de inmunidad adaptativa, como los receptores BCR de células B1 o TCR de células T intraepiteliales de mamíferos, ya que estas células reconocen componentes comunes a varios antígenos (Roitt & Male, 1998); comportándose de cierta forma como células no muy especializadas en la respuesta inmune adaptativa o como células que estarían entre la inmunidad natural y la inmunidad adaptativa.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron seis clonas de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la lectina de *MrL*. Con uno de ellos, 1F9 unido a peroxidasa, se estandarizó un sistema de ELISA para cuantificar a la concentración de lectina en hemolinfa.

Se determinó la concentración de lectina presente en cuatro estadios de maduración del langostino, observando que esta es en mayor concentración en jóvenes que en adultos.

La actividad hemaglutinante de la lectina se observó en eritrocitos de rata, pollo, y conejo.

Los azúcares que inhibieron la actividad hemaglutinante son: NeuGc, GlcNAc, GalNAc, NeuAc; y las proteínas IgA, Fetuina, Mucina submaxilar ovina y bovina.

La lectina podría participar activamente en el transporte de residuos de azúcar N-acetilados en organismos juveniles, dado que se necesita una mayor concentración de azúcar N-acetilado para inhibir su actividad hemaglutinante y en organismos adultos participa en el mecanismo de defensa.

Este es el primer trabajo que establece un método para determinar los parámetros de concentración de lectina en crustáceos y se propone como herramienta para estudiar el efecto de patógenos y contaminantes en la respuesta inmune de este organismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, G., R. Lascurain, A. Pérez, P. Degand, L.F. Montaña, S. Martínez-Cairo & E. Zenteno (1999). Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol. Invest.* 28:9-18.
- Amirante, G.A. (1992). Probable role of induced lectins in capsule formation in *Squilla mantis*. *L. Boll. Zool.* 59:153-158.
- Amirante, G.A. & V. Basso (1984). Analytical study of lectin in *squilla mantis Leucophaea maderae*. (Crustacea:Stomatopoda) using monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.* 8:721-726.
- Arason, G.D. (1996). Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates. *Fish and shellfish Immunology* 6:277-289.
- Ashwell, G. & J. Harford (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* 51:531-54.
- Avrameas, S & T. Ternyck (1971). Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8:1175-79.
- Bachere, E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191:3-11.
- Baldo, B.A., W.H. Sawyer, R.V. Stick & G. Uhlenbruck (1978). Purification and characterization of a galactan-reactive agglutinin from the clam *Tridacna maxima* (Roding) and a study of its combining. *Biochem. J.* 17:467-478.
- Bautista, C. *Crustáceos: Tecnología de cultivo*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España, 1988. pp. 93-126.
- Bayne, C.J. (1990). Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience* 40:723-731.
- Bidlingmeyer, B.A., S.A. Cohen & T.L. Tarvin (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 336:93-104.
- Bishayee, S. & D.T. Dorai (1980). Isolation and characterisation of a sialic acid-binding lectin (carcinoscorpín) from Indian horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*. *Biochim. Biophys. Acta.* 623:89-97.

- Boman, H.G. (1982). Humoral immunity in insects and the counter defense of some pathogens. *Fortsch. Zool.* 27:211.
- Boman, H. G. & D. Hultmark (1987). Cell-free immunity in insects. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:103-139.
- Boman, H.G., I. Nilsson-Faye, K. Paul & T. Rasmuson (1974). Insect Immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in the hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immunol.* 10:136-142.
- Boucias, D.G., S.Y. Hung, I. Mazet & J. Azbell (1994). Effect of the fungal pathogen, *Beauveria bassina*, on the lysozyme activity in *Spodoptera exigua* larvae. *J. Insect. Physiol.* 40:385-391.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Brock, J.A. A synopsis of pathology diseases and production problems of cultured *Macrobrachium*, with an emphasis on experiences in Hawaiian prawn farming. CRC Hand book of Mariculture. 2nd ed. vol. 1. J.P. McVey (Ed), Maryland, USA, 1993. pp. 361-391.
- Burnet, F.M. (1974). Invertebrate precursors to immune responses. *Comp. Top. Immunobiol.* 4:13-24.
- Cavalli, R.O., E. Vanden Berghe, P. Lavens, N.T. Thuy, M. Wille & P. Sorgeloos (2000). Ammonia toxicity as a criterion for the evaluation of larval quality in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 125:333-43.
- Cheng, W. & J.C. Chen (2000). Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 10:387-91.
- Cheng, W. & J.C. Chen (1998a). Enterococcus-like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity. *Dis. Aquat. Organ.* 34:103-8.

- Cheng, W. & J.C. Chen (1998b). Isolation and characterization of an Enterococcus-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan. *Dis. Aquat. Organ.* 34:93-101.
- Chen, J.C. & Y. Lee (1997). Effects of nitrite exposure on acid-base balance, respiratory protein, and ion concentrations of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* at low pH. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 33:290-7.
- Clezardin, P., J.L. McGregor, M. Manach, H. Boukerche & M. Dechavanne (1985). One-step procedure for the rapid isolation of mouse monoclonal antibodies and their binding fragments by fast protein liquid chromatography on a mono Q anion-exchange column. *J. Chromatogr.* 319: 67-77.
- Cohen, E. (1968). Immunologic observations of the agglutinins on the hemolymph of *Limulus polyphemus* and *Birgus latro*. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 30:427-32.
- Coombe, D.R., P.L. Ey & C.R. Jenkin (1984). Self/non-self recognition in invertebrates. *The Quarterly Review of Biology.* 59(B):231-255.
- Dandapat, J., G.B. Chainy & K.J Rao (2000). Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 127:101-15.
- Dazzo, F. & J. Sherwood. Trifoliin A: a Rhizobium recognition lectin in white clover roots. *Chemical Taxonomic, Molecular Biology and Function of Plant Lectins.* Goldstein I.J. y M.E. Etzler ed. 1983. pp. 209-223.
- Dorai, D.T., S. Srimal, S. Mohan, B.K. Bachahawat & T.S. Balganes (1982). Recognition of 2-keto-2-deoxyoctonate in bacterial cells and lipopolysaccharides by the sialic acid binding lectin from the horseshoe crab *Carcinoscopios rotunda cauda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104:141-47.
- Drickamer, K. (1993). Recognition of complex carbohydrates by Ca dependent animal lectins. *Biochem. Soc. Trans.* 21:456-459.
- Drickamer, K. & M.E. Taylor (1993). Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:237-64.

- Du pasquier, L. Evolution of the immune system. In: *Fundamental Immunology*. William E. Paul (Ed). 2ª Ed. Raven Press Ltd. N.Y. 1989. pp. 139-165.
- Duwel-Eby, L.E. & D. Karp (1990). The inducible humoral immune response to soluble proteins in the American Cockroach. *Defense Molecules* pp. 63-78.
- Engvall, E. & P. Perlmann (1971). Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-873.
- Fragkiadakis, G.A. & E.K. Stratakis (1997). The lectin from the Crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetylsialic acids. *Biochem. Mol. Biol.* 117:545-52.
- Freire-Márquez M.R. & M.A. Barracco (2000). Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191:23-44.
- Garvey, J.S., N.E. Cremer & D.H. Sussdorf. *Methods in immunology. A laboratory text for instruction and research*. 3er ed. Mass. USA. W.A. 1977. Benjamin, Inc Editores.
- Gross, P.S., W.Z. Al-Sharif, L.A. Clow & L.C. Smith (1999). Echinoderm immunity and the evolution of the complement system. *Dev. Comp. Immunol.* 23:429-442.
- Guevara, J., B. Espinosa, E. Zenteno, L. Vazquez, J. Luna, G. Perry & R. Mena (1998) Altered glycosylation pattern of proteins in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57:905-14.
- Hall, J.L. & D.T. Rowlands (1974). Heterogeneity of lobster agglutinins: II Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. *Biochemistry* 13:828-832.
- Hall, M. & R. Wang (1974). Heterogeneity of lobster agglutinins: I. purification and physicochemical characterization. *Biochemistry* 13:821-27.
- Harlow, E. & D. Lane. *Antibodies. A laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1998. Pp 139-319.
- Hernández, P., J. Barrios, M. Bacilo, M.T. Garcia, R. Coutiño & E. Zenteno. (1998). Funciones biológicas de las lectinas vegetales. *Mensaje Bioquímico* 22:247-258.
- Hildemann, W., E.A. Clark & R.L. Raison. *Phylogeny of Immunocompetence*. In "Comprehensive immunogenetics". Elsevier, New York, 1981. pp. 302-354.

- Hilgard, H.R., R.H. Wander & W.E. Hinds (1974). Specific receptors in relation to evolution of immunity. *Contemp. Top. Immunobiol.* 4:151-159.
- Hose, J.H., G.G. Martin & A.S. Gerard (1990). A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. *Biol. Bull.* 178:33-45.
- Imai, T., R. Goto, J. Kittarka & H. Kamiya (1994). Lectins in the rock lobster *Jasus novaehollandiae* hemolymph. *Crustaceana* 284:1313-1318.
- Iwanaga, S. & S.I. Kawabata (1999). Role of the lectins in the innate immunity of horseshoe crab. *Dev. Comp. Immunol.* 23:391-400.
- Johnson, H.M. (1964). Human blood group A-specific agglutinins of the butter clam *Saxidomus giganteus*. *Science* 146:548-50.
- Kaplan, R., S.S. Li & J.M. Kehoe (1977). Molecular characterization of limulin, a sialic acid binding lectin from the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. *Biochemistry* 16:4297-303.
- Köhler, G & C. Milstein (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Komano, H. & S. Natori (1985). Participation of *Sarcophaga peregrina* lectin in the lysis of sheep red blood cells injected into the abdominal cavity of larvae. *Dev. Comp. Immunol.* 9:31-36.
- Kongtawelert, P. (1998). Isolation and characterization of a lectin Thai ma crab (*Scylla serrata*) with binding specificity to sialoglycoconjugates and its application. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7:280-286.
- Kopacek, P., L. Grubhoffer & K. Söderhäll (1993). Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Dev. Comp. Immunol.* 17:407-418.
- Kornfeld, S. (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61:307-30.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

- Law, A.T. & M.E. Yeo (1997). Toxicity of phenol on *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) eggs, larvae, and post-larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58:469-74.
- Le Moullac, G. & P. Haffner (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191:121-131.
- Lis, H. & N. Sharon (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* 55:35-67.
- Lis, H. & N. Sharon (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* 98:637-674.
- Lombardi, J.V., J.G. Machado-Neto, A.L. Brossi-Garcia, H.L. Marques & E. Kubo (2000). Acute toxicity of the fungicide copper oxychloride to the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65:383-90.
- Marchalonis, J.J. & G.M. Edelman (1968). Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *J. Mol. Biol.* 32:467-470.
- Mauchamp, B. (1982). Purification of a N-acetyl-D-glucosamine specific lectin (P.B.A.) from epidermal cell membrane of *Pieris brassicae*. *L. Biochimie.* 64:1001-1012.
- Mauchamp, B. & M. Hubert (1984). Internalization of plasma membrane glycoconjugates and plasma membrane lectin into epidermal cells during pharate adult wing development of *Pieris brassicae*: correlation with resorption of molt fluid components. *Biol. Cell.* 50:285-294.
- McCoy, J.J., B.J. Mann & W.A.Jr. Petri (1994). Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect. Immun.* 62:3045-50.
- McEver, R.P., K.L. Moore & R.D. Cummings (1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* 270:11025-8.
- Mercy, P.C. & H. Ravindranath (1993). Purification and characterization of N-Glycolylneuraminic-acid-specific lectin from *Scylla serrata*. *Eur. J. Biochem.* 125:697-704.

- Miller, R.L. (1987). Properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*. *Methods Enzymol.* 138:527-36.
- Mirelman, D., E. Galun, N. Sharon & R. Lotan (1975). Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. *Nature* 256:414-16.
- Mohan, S., D.T. Dorai, S. Srimal & B.K. Bachhawat (1982). Binding studies of a sialic acid-specific lectin from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda* with various sialoglycoproteins. *Biochem. J.* 203:253-61.
- Muramoto, K., K. Ogata & H. Kamyia (1985). Comparison of the multiple agglutinins of the acrons barnacle *Megabalanus rosa*. *Agric. Biol. Chem.* 49:85-93.
- Muta, T. & Y.S. Iwanaga (1996). The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8:41-47.
- Nappi, A.J. & E. Ottaviani (2000). Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22:469-480.
- Ofek, I., J. Goldhar, Y. Keisari & N. Sharon (1995). Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:239-76.
- Parish, C.R. (1977). Simple model for self-non-self discrimination in invertebrates. *Nature* 267:711-713.
- Peebles, J.B. (1977). A rapid Technique for molt starting in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 12:173-180.
- Peng, S.E., C.F. Lo, C.H. Ho, C.F. Chang & G.H. Kou (1998). Detection of white spot baculovirus (WSBV) in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, using polymerase chain reaction. *Aquaculture* 164:253-262.
- Persson, M., A. Vey. & K. Soderhall (1987). Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell. Tissue. Res.* 247:409-415.
- Pilatte, Y., J. Bignon & C.R. Lambre. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: patophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 3: 207-217.
- Pusztai, A. *Plant lectins*. Cambridge University Press. Cambridge U.K. 1991. pp. 32-38.

- Ravindranath, M.H., H.H. Higa, E.L. Cooper & J.C. Paulson (1985). Purification and characterization of an O-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. *J. Biol. Chem.* 260:8850-56.
- Renwantz, L. (1986). Lectins in mollusc and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 56:81-93.
- Rinkevich, B. (1999). Invertebrates versus vertebrates innate immunity. In the light of evolution. *Scand J Immunol.* 50:456-60.
- Roitt, I., J. Brostoff & D. Male. *Immunology*. Ed. Mosby. Londres, Inglaterra. 5ª ed. 1998. pp. 199-220.
- Rostam-Abadi, H. & T.C. Pistole (1982). Lipopolysaccharide-binding lectin from the horse-shoe crab, *Limulus polyphemus*, which specificity for 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO). *Dev. Comp. Immunol.* 6:209-18.
- Sahul Hameed, A.S., M. Xavier Charles & M. Anilkumar. (2000). Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus. *Aquaculture* 183:207-213.
- Sharon, N. & H. Lis (1987). A century of lectin research (1888-1988). *Trend Biochem. Sci.* 12:488-491.
- Shishikura, F. & K. Sekiguchi (1984). Studies on the perivitelline fluid of horseshoe crab embryo. Purification of agglutinin-binding substance from the perivitelline fluid of *Tachypleus gigas* embryo. *J. Biochem.* 96:629-632.
- Sierra, C., A. Pérez, C. Agundis, E. Zenteno & L. Vázquez. Subcellular localization of a seric lectin in haemocytes from *Macrobrachium rosenbergii* (Decapoda, Nanantia) and its role in phagocytosis. In Schram F.R., von Vaupel Klein J.C. (Eds). *Crustacean and the Biodiversity Crises*, Brill, Leiden Boston Köln. 1998, 1:961-70.
- Singhal, A. & S. Hakomori (1990) Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays* 12:223-30.
- Soderhall, K. (1982). Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods. A review. *Dev. Comp. Immunol.* 6:601-611.

- Soderhall, K., A. Vey & M. Ramstedt (1984). Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 8:23-29.
- Soderhall, K., V.J. Smith & M.W. Johanson (1986). Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular cooperation in the defense reactions of arthropods. *Cell. Tissue. Res.* 245:43-49.
- Spiro, R.G., Q. Zhu, V. Bhoyroo & H.D. Soeling (1996) Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J. Biol. Chem.* 271:11588-11594.
- Sung, H.H., S.F. Hwang & F.M. Tasi (2000). Responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) to challenge by two strains of *Aeromonas* spp. *J. Invertebr. Pathol.* 76:278-84.
- Toda, M., M. Jimbo, K. Muramoto, R. Sakai & H. Kamiya (1998). Isolation and characterization of a D-galactose-binding lectin from the acorn barnacle *Balanus rostratus*. *Fish. Sci.* 64:638-642.
- Towbin, H.; T. Staehelin, & J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Tsuboi, I., M. Matsukawa & N. Sato (1993). Isolation and characterization of a sialic acid-specific lectin from hemolymph of the Southeast Asian horseshoe crab *Tachypfeus gigas*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:1237-42.
- Uhlenbruck, G. & O. Prokop (1966). An agglutinin from *Helix pomatia*, which reacts with terminal N-acetyl-D-galactosamine. *Vox Sang.* 11:519-20.
- Umetsu, K., K. Yamashita & T. Susuki (1991). Purification and carbohydrate binding specificity of a blood-type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charibdis japonica*). *J. Biochem.* 109:718-721.
- Van de Vyver, G., S. Holvoet & P. Dewint (1990). Variability of the immune response in freshwater sponges. *J. Exp. Zool.* 254:215-227.

- Varki, A. (1992). Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2:25-40.
- Varki, A. (1997). Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB. J.* 248-255.
- Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart & J. Marth. Essentials of glycobiology. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A. 1999.
- Vasta, G.R. Invertebrate lectins, distribution, synthesis, molecular biology and function. In: Glycoconjugates Howard J. Allen and E.C. Kisailus (Eds). Buffalo, New York. 1992. pp. 593-634.
- Vasta, G.R. & E. Cohen (1984). Carbohydrate specificities of *Birgus latro* (coconut crab) serum lectins. *Dev. Comp. Immunol.* 8:197-202.
- Vasta, G.R., G.W. Warr & J.J. Marchalonis (1983). Serological characterization of humoral lectins from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Dev. Comp. Immunol.* 7:13-20
- Vasta, G.R., H. Ahmed, N.E. Fink, M.T. Elola, A.G. Marsh, A. Snowden & W. Odom (1994). Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Biochemical and genetic approaches to understanding their biological roles and evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 712:55-73.
- Vasta, G.R., T. C. Cheng & J.J. Marchalonis (1984). A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). *Cell. Immunol.* 8:475-485.
- Vázquez, L., C. Sierra, S. Juárez, C. Agundis, A. Zavala & E. Zenteno. (1998) Mecanismos de inmunidad en crustáceos. *InterCiencia* 23:344-348.
- Vázquez, L., F. Masso, P. Rosas, L.F. Montañó & E. Zenteno. (1993) Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea, decapoda) hemolymph. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B:617-623.
- Vázquez, L., G. Maldonado, C. Agundis, A. Pérez, E.L. Cooper & E. Zenteno. (1997) Participation of a Sialic acid-specific lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells. *J. Exp. Zool.* 279:265-272.

- Vázquez, L., H. Lanz, L.F. Monataño, L. Vázquez & E. Zenteno. Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. In: Lectins: biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Eds. E.V. Driessche, J. Fischer, S. Beekmans y T.C. Bog-Hansen. 1994. 10:261-265.
- Vázquez, L., L. Jaramillo, R. Lascurain, E.L. Cooper, P. Rosas & E. Zenteno. (1996) Bacterial agglutination by the Sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. 113B:355-359.
- Vici, V., I.S. Bright Singh & S.G. Bhat (2000). Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. Fish Shellfish Immunol.10:559-63.
- Viele, M., E. Donegan & E. Bossom. Banco de sangre e inmunohematología. In Inmunología básica y clínica. Eds Stites, D.P. A.I. ETR y T.G. Parslow. Manual moderno, D.F. Mexico. 1997. pp 319-332.
- Wickins, J.F. & T.W. Beard (1974). Observations on the breeding and growth of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in the laboratory. Aquaculture 3:159-174.
- Zanetta J.P., P. Timmerman & Y. Leroy (1999). Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. Glycobiology 9:255-266.
- Zenteno, R., L. Vázquez, C. Sierra, A. Pereyra, M-C. Slomianny, S. Bouquelet & E. Zenteno (2000). Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF. Comp. Biochem. Physiol. B. 127:243-250.