

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

POSTGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA SOLUBLE  
DEL LANGOSTINO *Macrobrachium rosenbergii* Y  
DETERMINACIÓN DE SU PARTICIPACIÓN EN  
LOS MECANISMOS DE DEFENSA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. EN C. MOHAMED ALI PEREYRA MORALES

MÉXICO. D. F.



DICIEMBRE, 2004

COORDINACIÓN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno PEREYRA MORALES MOHAMED ALI con número de cuenta 89042755 y número de expediente 3991162, con la tesis titulada: "Caracterización química de la lectina soluble del langostino *Macrobrachium rosenbergii* y determinación de su participación en los mecanismos de defensa", bajo la dirección del Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo.

Presidente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Vocal:	Dr. Carlos Rosas Vázquez
Vocal:	Dr. Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros
Vocal:	Dr. Ricardo Lascurain Ledesma
Secretario:	Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
Suplente:	Dra. Luisa Alvarina Alba Lois
Suplente:	Dra. Lorena Vázquez Navarrete

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de noviembre del 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

**Mi mas sincero agradecimiento a los miembros del comité tutorial:**

**Dr. Edgar Zenteno Galindo**

**Dr. Ricardo Lascurain Ledesma**

**Dra. Lorena Vázquez Navarrete**

**por los comentarios y sugerencias en el desarrollo de la tesis.**

**Este trabajo fue financiado por:**

**DGAPA PAPIIT-UNAM No. IN213902**

**CONACYT (Beca de Doctorado) No. 130064**

**Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.**

**IMSS, Coordinación de Investigación Clínica**

La presente tesis se desarrollo en el laboratorio No. 6 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM y en el laboratorio de Lectinas del Centro de Investigaciones Químicas, UAEM, bajo la dirección de las Doctoras Concepción Agundis Mata y Lorena Vázquez Navarrete.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora *Concepción Agundis* y al Doctor *Edgar Zenteno*, por la motivación y el apoyo recibido en todos estos años de trabajo.

A la Doctora *Lorena Vázquez* y al Doctor *Ricardo Lascurain*, por sus comentarios, críticas y sugerencias en la realización de esta tesis.

Al Dr. *Guillermo Mendoza*, por las facilidades prestadas para el feliz termino del proyecto.

A todos los miembros del jurado de examen, por los comentarios y precisiones hechas para el mejoramiento del trabajo.

A los compañeros del laboratorio *Juan Alpuche, Alfonso de la Mora, Carlos Solórzano, Sandra Suárez*, por el fabuloso ambiente de trabajo.

A todos los que me faltaron.

*A mis padres, Teodora y Enrique,  
a mis hermanos, Marbella y Edmundo  
por el apoyo, consejos, recomendaciones  
y sugerencias en mi vida.*

*A mi hijo Adair  
por ser mi mayor  
motivación para continuar.*

*A mi esposa Eugenia  
por tu paciencia y apoyo,  
porque éste también es un logro tuyo.*

*A Edgar Zenteno  
por brindarme la oportunidad  
de realizar este trabajo.*

*A la Dra. Concepción Agundis  
por su tiempo, consejos, regaños  
pero sobre todo por el empujoncito  
que me dio en el momento oportuno.*





## ÍNDICE

Resumen.....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Generalidades de la respuesta inmune innata en vertebrados.....	10
Respuesta inmune en invertebrados.....	10
El langostino <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	13
Lectinas.....	14
Justificación.....	20
Objetivos.....	21
Hipótesis.....	21
Material y métodos.....	22
Organismos.....	22
Purificación de lectina.....	22
Caracterización química de la lectina MrL.....	23
Procedimientos analíticos.....	23
Determinación del peso molecular de la lectina.....	23
Análisis de la secuencia del amino terminal.....	24
Anticuerpos monoclonales.....	24
Determinación de la concentración de lectina en diferentes estadios del langostino <i>M.</i> <i>rosenbergii</i> .....	27
Inmunoelectrotransferencia.....	29
Determinación de la estructura secundaria por dicroísmo circular.....	29
Actividad hemaglutinante.....	30

Participación de la lectina MrL en los mecanismos de defensa del langostino.....	30
Preparación de células.....	30
Microscopia confocal.....	31
Ensayos de fagocitosis in vitro.....	31
Determinación del estallido respiratorio.....	32
Especificidad de MrL.....	33
Análisis estadístico.....	33
Regulación de la lectina MrL.....	33
Purificación de agregados de lectina.....	33
Determinación de isoformas de MrL.....	34
Perfil de péptidos.....	34
Cuantificación del contenido de lectina en las diferentes fracciones purificadas de la hemolinfa del langostino <i>M. rosenbergii</i> .....	35
Estructura secundaria por dicroísmo circular.....	35
Actividad hemaglutinante.....	35
Resultados.....	36
Langostinos.....	36
Purificación de lectina de la hemolinfa del langostino <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .....	36
Anticuerpos monoclonales.....	36
Caracterización química de la lectina MrL.....	38
Determinación del contenido de lectina en diferentes estadios del langostino <i>M. rosenbergii</i> .....	40
Estructura secundaria.....	40
Actividad hemaglutinante.....	43
Participación de la lectina MrL en los mecanismos de defensa del langostino.....	44
Identificación de hemocitos con MrL y AcM 3G1.....	44

Actividad fagocítica de hemocitos.....	45
Estallido respiratorio .....	45
Efecto de los inhibidores en el estallido respiratorio.....	48
Efecto de azúcares y glicoproteínas en la fagocitosis de eritrocitos y en el estallido respiratorio.....	49
Regulación de la lectina MrL.....	50
Purificación de agregados de lectina.....	50
Caracterización química de la lectina MrL-I.....	52
Secuencia de aminoácidos y análisis del perfil de péptidos.....	53
Estructura secundaria.....	55
Actividad hemaglutinante.....	55
Discusión.....	57
Caracterización química de la lectina MrL.....	57
Participación de la lectina MrL en los mecanismos de defensa del langostino.....	60
Regulación de la lectina MrL.....	63
Conclusiones.....	66
Bibliografía.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

### Tablas

Tabla 1. Clasificación de las lectinas animales.....	16
Tabla 2. Esquema de inmunización de los ratones de fusión.....	25
Tabla 3. Proceso de purificación de la lectina de <i>M. rosenbergii</i> , en estroma de eritrocitos de rata.....	37
Tabla 4. Composición de aminoácidos (%) de las lectinas MrL-I y MrL-III purificadas por cromatografía de afinidad.....	39
Tabla 5. Composición de carbohidratos (%) de las lectinas MrL-I y MrL-III purificadas por cromatografía de afinidad.....	40
Tabla 6. Determinación de la concentración de lectina por ELISA, en la hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> en diferentes estadios de maduración.....	41
Tabla 7. Concentración de calcio en lectina de langostino adulto MrL.....	42
Tabla 8. Estructura secundaria (%) para MrL obtenida por difracción circular.....	42
Tabla 9. Actividad hemaglutinante de la hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> en diferentes estadios de maduración.....	43
Tabla 10. Concentraciones mínimas ( $\mu\text{M}$ ) de azúcares y glicoproteínas que inhiben la actividad hemaglutinante de la hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> .....	44
Tabla 11. Actividad fagocítica y reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) de hemocitos del langostino en presencia de eritrocitos.....	47
Tabla 12. Efecto de carbohidratos (100 mM) y glicoproteínas (0.1 M) en la actividad fagocítica de los hemocitos y, reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT), en presencia de eritrocitos de rata.....	51

Tabla 13. Proceso de purificación de la lectina de <i>M. rosenbergii</i> (100 mg de proteína).....	53
Tabla 14. Masas comunes de los péptidos tripticos obtenidos a partir de las lectinas MrL-I y MrL-III.....	56

## **Figuras**

Figura 1. Perfil de elución de la lectina MrL purificada por cromatografía de afinidad con estroma de eritrocitos de rata-Sephadex G-25.....	37
Figura 2. Electroforesis en gel de poliacríamida (10%) SDS-PAGE de la lectina y agregados (MrL-I y MrL-III), de <i>M. rosenbergii</i> .....	38
Figura 3. Inmunoelctrotransferencia de la lectina y agregados (MrL-I y MrL-III) de <i>M. rosenbergii</i> .....	39
Figura 4. Curva estándar para determinar concentración de MrL por ELISA.....	41
Figura 5. Microscopia confocal de hemocitos de <i>M. rosenbergii</i> marcados con lectina sérica y AcM 3G1.....	46
Figura 6. Efecto de la lectina sérica MrL y anticuerpos monoclonales AcM 3G1 en el estallido respiratorio.....	48
Figura 7. Inhibición del estallido respiratorio de hemocitos de <i>M. rosenbergii</i> por MrL y AcM 3G1.....	49
Figura 8. Filtración en gel de la hemolinfa de <i>M. rosenbergii</i> , en Sephacryl S-200 HR.....	52
Figura 9. Cromatografía de afinidad de la lectina y agregados (Mr-I y Mr-III), de <i>M. rosenbergii</i> en fetuina agarosa. ....	54
Figura 10. Cromatografía de intercambio aniónico en mono P-HR 5/25 de la lectina pura, MrL-I y MrL-III.....	55

## ABREVIATURAS

AcM 3G1	Anticuerpo Monoclonal Murino 3G1
AcM 3G1-P	AcM 3G1 acoplado peroxidasa
AE	Actividad Especifica
AF	Actividad fagocítica
D.O.	Densidad óptica
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EDTA	Ácido etilendiaminoacético,
EGTA	Ácido etilenglicol bis (b aminoetileter) n'n'n'n'- tetracético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
ER	Estallido respiratorio
FPLC	Cromatografía líquida de rápida resolución
Gal	Galactosa
GalNAc	N-Acetil-D-galactosamina
GlcNAc	N-Acetil-D-glucosamina
IL	Interleucina
kDa	Kilo Daltons
MALDI-TOF	Desabsorción láser matriz asistida e ionización de tiempo de vuelo
Man	Manosa
MrL	Lectina de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
MrL-I	Lectina agregada de <i>M. rosenbergii</i>
MrL-III	Lectina de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>
NBT	Nitroazul de tetrazolio
Neu5Ac	Acido N-Acetil neuranimico
OPD	Orto fenil diamina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-T	PBS-Tween
PMA	Phorbol 12-myristate 13 acetate
ProPO	Profenoloxidasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Enzima súper oxido dismutasa
TBS	Amortiguador salino de tris
TT	Ácido etilendinitrilotetracético
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 (MrL) por cromatografía de afinidad. MrL es una glicoproteína de 19 kDa, compuesta principalmente por glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico, en menor cantidad se encuentran metionina e histidina; contiene 11% de azúcares, entre ellos ácido siálico (NeuAc), galactosa (Gal), manosa (Man) y N-acetil glucosamina (GlcNAc). El amino terminal que se identificó es DVPL(L/A). Con un método de ELISA, usando anticuerpos monoclonales contra MrL (AcM 3G1), se identificó que la lectina representa el 1.5% de la proteína total de la hemolinfa de langostinos juveniles, mientras que en adulto, la lectina representa el 0.5%. MrL aglutina eritrocitos de rata, conejo y pollo, y la mayor actividad se observó en organismos adultos. MrL reconoce N-acetil galactosamina (GalNAc), GlcNAc y NeuAc; así como sialoglicoproteínas como fetuina, IgA, mucina submaxilar bovina y ovina. Por ensayos de reducción de NBT y fagocitosis, se identificó que la producción del anión superóxido en los hemocitos estimulados con MrL, AcM 3G1 o phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) incrementaron 4.7, 5.1, y 6.1 veces, respectivamente, la respuesta oxidativa comparado con hemocitos no estimulados. La capacidad oxidativa de los hemocitos se incrementó 5.7 veces cuando se estimuló con AcM 3G1 y MrL, comparado con células no estimuladas. Estos efectos se inhibieron con los azúcares específicos (GalNAc, GlcNAc y NeuAc). Por filtración en gel y cromatografía de afinidad se aisló un agregado de MrL (>200 kDa), reconocido por AcM 3G1 y sin actividad aglutinante. La composición de aminoácidos es similar a MrL, así como la secuencia amino terminal DVPL(L/A)XKQQQD. Aunque presenta diferencias en la composición, en la concentración de carbohidratos y en el patrón de péptidos tripticos, analizados por MALDI-TOF. El dicroísmo circular indica que ambas proteínas contienen estructura secundaria similar (23% de lámina- $\beta$  y 24% de  $\alpha$ -hélice). Los datos obtenidos sugieren que la lectina sigue diferentes procesos postraduccionales, -posiblemente de glicosilación-, para ser expresada en forma agregada o soluble. La lectina podría funcionar como reguladora del metabolismo de carbohidratos o en el sistema inmune del crustáceo.

## **ABSTRACT**

The freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, is crustacean specie of worldwide interest due to its great capacity to be cultured in freshwater farms. By affinity chromatography, we purified a lectin (MrL) from prawn's hemolymph. MrL is a 19-kDa glycoprotein; constituted by glycine, serine, glutamic acid and aspartic acid, principally, and contains methionine and histidine in minor proportion; MrL has 11% of carbohydrate contenty, constituted by sialic acid (NeuAc), galactose (Gal) mannose (Man) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc). The NH<sub>2</sub>-terminal sequence of five amino acids of the lectin [DVPL(L/A)] was obtained by Edman degradation. By ELISA, using monoclonal antibodies against MrL (Mab 3G1), we identified that the lectin in the juvenile prawn contained the 1.5% of the total protein present in the hemolymph, while in the adults, the lectin proportion is the 0.5%. MrL agglutinates erythrocytes from rat, rabbit and chicken and the higher activity was from adult specimens. MrL recognised N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc), GlcNAc y NeuAc. Fetuin, IgA, mucin bovin, were the glyoproteins recognized by the lectin. Using a spectrophotometric NBT reduction assay and phagocytosis, we identified that production of superoxide anions and phagocytic activity of hemocytes stimulated with MrL, monoclonal antibody 3G1, or phorbol 12-myristate 13 acetate increased 4.7, 5.1, and 6.1 fold, respectively, the oxidative response as compared to non-stimulated hemocytes. MrL Mab together with MrL increased 5.7 fold the oxidative capacity of hemocytes as compared to non-stimulated cells. These effects were inhibited with GalNAc, GlcNAc, or Neu5Ac. By gel filtration and affinity chromatography, we purified a lectin aggregate (> 200 kDa), recognized by AcM 3G1 without hemagglutinating activity. The amino acid composition is similar and Edman degradation indicated the same NH<sub>2</sub>-terminal sequence in both proteins. Biochemical analysis shown differences in carbohydrate composition and concentration and analysis by MALDI-TOF indicated a different tryptic pattern for MrL-I and MrL-III. Circular dichroism indicated that the secondary structure in both proteins is similar and contains 23% of b-sheet and 24% of a-helix. Our results suggest that differential post-translational processes that favor aggregation are involved in regulating the activity of the lectin. The lectin must have functions in the transport of sugars or in the immune system of the crustacean.



## **INTRODUCCION**

### ***Generalidades de la respuesta inmune innata en vertebrados***

En los vertebrados, la primera línea de defensa la constituyen las células epiteliales. Los patógenos que logran pasar esta barrera, se encuentran con el ataque humoral del huésped bien sea por la activación de la vía alterna del complemento o por su ingestión mediante el reconocimiento específico de componentes microbianos y posterior destrucción por células fagocíticas. La regulación de la respuesta inmune, aún la innata, puede ser el resultado de la interacción de interleucinas con sus receptores, por ejemplo IL-6 e IL-1, la inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda, como la proteína C reactiva y la proteína de unión a manosa, ambas con capacidad de opsonizar bacterias y activar la cascada del complemento. La siguiente fase de reconocimiento está dada por los linfocitos T y B, que son parte de la respuesta inmune adaptativa, este tipo de respuesta se caracteriza por ser específica (Roitt, 1998).

### ***Respuesta inmune en invertebrados***

Con el propósito de conocer los mecanismos de inmunidad en invertebrados, se han realizado diversos estudios, Du Pasquier (1989) y Hildemann (1974), demostraron que todas las formas de vida han creado un sistema de defensa eficaz contra diversos patógenos o parásitos, mientras que Ratcliffe (1989), considera que tanto la inmunidad en crustáceos, como en vertebrados, es posible gracias a la cooperación de procesos tanto celulares como humorales. El sistema inmunológico de los invertebrados se caracteriza por la carencia de memoria, representado en los vertebrados por las inmunoglobulinas y por grupos de células linfoides que poseen receptores que identifican antígenos de histocompatibilidad (Du Pasquier, 1989). Se considera que la respuesta inmune en crustáceos, es exclusivamente de tipo innata, siendo las barreras físicas el primer obstáculo para los microorganismos patógenos. Cuando hay daño tisular y los microorganismos logran invadir los tejidos, rápidamente se desencadenan cascadas proteolíticas que permiten eliminar o disminuir la cantidad de microbios que invadan al crustáceo. Los mecanismos por los que se da este tipo de respuesta, incluyen; la cascada de la coagulación, mediante el cual se evita la

pérdida de hemolinfa del crustáceo y a su vez activa otro proceso, el sistema de la profenoloxidasa (proPO, Lee & Soderhall, 2002).

*El sistema de activación de la profenoloxidasa:* son un grupo de reacciones enzimáticas con funciones similares a la cascada del complemento en vertebrados. Este sistema es activado por lipopolisacáridos (LPS) o el  $\beta$ -1,3-glucano, carbohidratos de la pared celular de bacterias Gram negativas y hongos, también se ha identificado que la liberación de algunos compuestos presentes en los gránulos de los hemocitos pudieran provocar la activación del sistema de la profenoloxidasa (Söderhäll & Smith, 1986). El mecanismo de activación del sistema de la proPO comprende una serie de reacciones enzimáticas en cascada en las que participa por lo menos una serin-proteasa con liberación de diversos factores. En crustáceos, el primer precursor enzimático se encuentra inactivo en los hemocitos y/o hemolinfa. La proPO, convierte a la tirosina en DOPA y a esta en DOPA-quinona precursor de la melanina, pigmento pardo-negruzco con diversas propiedades biológicas, entre otras la inhibición de la actividad de enzimas bacterianas y fúngicas (Smith & Söderhäll, 1983). De los factores que se liberan durante la activación de este sistema, el más estudiado es el factor de adhesión, que recubre de manera inespecífica a los microorganismos invasores permitiendo su adhesión, este factor provoca la amplificación del sistema de la profenoloxidasa, mediante la desgranulación de células, (Johansson & Söderhäll, 1989). El factor de adhesión también es responsable de la estimulación del proceso de fagocitosis para células hialinas del cangrejo europeo *Carcinus maenas* (Thornqvist *et al.*, 1994).

*La encapsulación:* este es un tipo de respuesta multicelular que permite la eliminación de partículas extrañas que no pueden ser fagocitadas ni destruidas por otros mecanismos. Se considera que este proceso da muerte a los patógenos o por lo menos restringe su movimiento y crecimiento en la cavidad del hemocele. Este mecanismo provoca la muerte de los organismos encapsulados por la disminución de la concentración de oxígeno, la participación de hidrolasas y la acción tóxica de quinonas (Persson & Söderhäll, 1987; Durliat, 1985). En los cangrejos, la respuesta a la encapsulación esta inducida por células

semigranulares (Johansson *et al.*, 2000). Dentro de los factores séricos descritos que participan en este mecanismo, existe un factor promotor de la encapsulación en el insecto *Heliothis virescens* (Davies *et al.*, 1988) y una lectina de *Bombyx mori* (Kotani *et al.*, 1995).

*Péptidos antimicrobianos:* En la respuesta inmune innata de invertebrados intervienen péptidos antimicrobianos, con actividad contra un amplio rango de agentes patógenos, mencionaremos a la melitina, que es un péptido proveniente del veneno de la abeja con actividad antibacteriana (Subbalakshmi *et al.*, 1999). En camarones como el *Litopeneus vannamei* existe una familia de péptidos antimicrobianos, llamados penaedinas, que son transportados por los hemocitos a través del plasma hasta sitios expuestos a microorganismos patógenos (Destoumieux *et al.*, 2000). En el mismo organismo y en *P. stylirostris*, se han descrito también péptidos derivados de la hemocianina con actividad fungicida (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2001). Se ha propuesto que estos péptidos interactúan con la membrana microbiana, comprometiendo su permeabilidad (Subbalakshmi *et al.*, 1999). Las proteínas antibacterianas son muy eficientes en la protección de los organismos a infecciones; en insectos, pudieran representar el único mecanismo de defensa natural contra la flora intestinal durante eventos metamórficos (Boman *et al.*, 1974).

*La fagocitosis:* En invertebrados, la fagocitosis la realizan los hemocitos, es un mecanismo mediante el cual se eliminan partículas extrañas como bacterias, esporas e incluso células envejecidas del propio organismo (Tyson & Jenkin, 1974; McCumber *et al.*, 1979). Los mecanismos de reconocimiento del material que será fagocitado no se han identificado plenamente, aunque se piensa que factores séricos, como moléculas de adhesión o algunos productos derivados del sistema de la profenoloxidasa, influyan en esta actividad (Söderhäll & Smith, 1986); de igual forma se ha sugerido la participación de lectinas, que al reconocer carbohidratos de forma específica aglutinan algunas bacterias, actuando de manera similar a las opsoninas, facilitando por ende la fagocitosis, o ser lectinas de membrana de hemocitos, funcionando en la lectinofagocitosis (Bayne, 1990; Ofek & Sharon, 1988; Vázquez *et al.*, 1997).

### ***El langostino Macrobrachium rosenbergii***

Los decápodos, entre otros crustáceos, representan un grupo de invertebrados de gran interés económico debido a su alto valor alimenticio y fácil adaptación al cultivo acuícola. En México existen doce especies de langostino del género *Macrobrachium*, algunas de ellas son explotadas en cultivos semi-intensivos, por la demanda que tienen, por su alto contenido proteico. En el estado de Morelos, se establecieron programas de cultivo del langostino malayo, *Macrobrachium rosenbergii* en granjas comunitarias, esta especie fue considerada por características 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 como Tailandia y Hawai dedicados al cultivo y engorda del langostino, han demostrado que pueden ser afectados por diversos patógenos según su estadio de desarrollo como 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 Tricomycetos), insectos (huevecillos de *Ramphocorixa acuminata*), el tremátodo *Carneophallus choanophallus*, el nemátodo *Angiostrongylus cantonensis* e isópodos (*Probopyrus* sp), que pudieran afectar al langostino, y causar merma importante en su producción (Bautista, 1988; Brock, 1993).

El conocimiento de la inmunidad en crustáceos de uso alimenticio, está enfocado fundamentalmente a camarones, incluye factores ambientales y control de enfermedades (Bachere, 2000; Le Moullac & Haffner, 2000), sin embargo, poco se sabe de proteínas u otras moléculas que participen en el proceso de la inmunidad y/o en la respuesta inmune. Actualmente se realizan trabajos para conocer el efecto que tienen algunos compuestos en el sistema inmune de crustáceos comestibles (incluido el langostino *M. rosenbergii*), tales como contaminación por amonio, nitrito y fenol (Cavalli *et al.*, 2000; Chen & Lee, 1997; Law & Yeo, 1997; Lombardi *et al.*, 2000), factores químicos, como el pH, temperatura o salinidad (Cheng & Chen 2000<sup>a</sup>), microorganismos causantes de infecciones virales o bacterianas, etc. (Cheng & Chen 1998<sup>a</sup>, Cheng & Chen

1998<sup>b</sup>; Peng *et al.*, 1998; Sahul-Hameed *et al.*, 2000; Sung *et al.*, 2000; Vici *et al.*, 2000), así como los efectos de la alimentación y las vitaminas (Dandapat *et al.*, 2000). 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, como las lectinas.

### **Lectinas**

La existencia de las lectinas ha sido conocida desde hace más de cien años (Sharon & Lis, 1987). Las primeras lectinas detectadas fueron las de origen vegetal, sin embargo, desde hace varias décadas se ha enfocado la atención a lectinas presentes en vertebrados así como a aquellas identificadas en la hemolinfa y extracto tisular de diferentes especies, clases y subclases de invertebrados (Drickamer & Taylor, 1993; Arason, 1996). Las lectinas de invertebrados se han aislado principalmente de la hemolinfa y órganos sexuales, de glándulas de albúmina y huevos (Arason, 1996; Komano & Natori, 1985).

Las lectinas son proteínas que abundan en la naturaleza, y que tienen como característica reconocer carbohidratos, la interacción de la lectina con el carbohidrato es de tipo no covalente. Estas proteínas no son de origen inmune, no presentan actividad enzimática y por lo regular tienen capacidad mitógena, ya que poseen dos o más dominios de unión a carbohidratos, por lo que, al interactuar con receptores la membrana de las células inducen entrecruzamiento de los receptores sacarídicos provocando señalización a través de segundos mensajeros para generar activación y síntesis de proteínas. Una propiedad de las lectinas es la de provocar aglutinación de diversos grupos celulares como eritrocitos. De la misma manera pueden reaccionar con glicoproteínas o polisacáridos, e inducir precipitación. Estas son las características que permiten detectar a las lectinas (Hernández *et al.*, 1998; Vázquez *et al.*, 1998).

Se han identificado lectinas en prácticamente todos los organismos vivos, desde virus hasta vertebrados, y en cada organismo se han propuesto diferentes funciones: en el virus, reconocimiento del huésped al mediar la adhesión a las células del hospedero, de modo que ayuda a que se inicie la infección (McCoy *et*

*al.*, 1994). En los vegetales, se han asociado con el transporte, movilización 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 la planta contra hongos fitopatógenos (Mirelman, *et al.*, 1975), y existen evidencias para proponer que participan en el reconocimiento de moléculas extrañas (Pusztai, 1991), así como en la unión de bacterias fijadoras de nitrógeno, del genero rhizobia por lectinas de leguminosas (Dazzo & Sherwodd, 1983).

*Clasificación de lectinas animales:* en sus inicios, a las lectinas se les clasificó de acuerdo al carbohidrato que reconocían, por ejemplo, se encontraban lectinas de unión a  $\beta$ -galactosidos, posteriormente se realizó una clasificación, basándose en similitudes en la secuencia de aminoácidos, del sitio de reconocimiento al carbohidrato (CRD; Drickamer, 1988), así, se agruparon las lectinas en: lectinas tipo C, tipo S, tipo P y lectinas tipo I (Tabla 1); sin embargo, las lectinas que se desconoce su secuencia, se han agrupado de acuerdo a sus similitudes en el reconocimiento o en base a su origen (Tabla 1).

*Función de lectinas en animales:* Las funciones biológicas de las lectinas animales son muy diversas: favorecen la adhesión celular, a través de galectinas, también pudieran participar en la metástasis de células cancerígenas en ratones y humanos (Lis & Sharon, 1998); las lectinas endocíticas son receptores de membrana, como el receptor asialoglicoproteína hepática de mamífero, que facilita la eliminación de la circulación de glicoproteínas con unidades complejas de oligosacaridos (Ashwell & Harford, 1982), también se han visto involucradas en la respuesta inmune innata, por un lado, el receptor específico de manosa presente en macrófagos en la defensa contra microbios, provoca la lectinofagocitosis (Ofek *et al.*, 1995) y por otro lado la activación del complemento, por las lectinas MBP (por sus siglas en ingles "Mannose Binding Protein"), las que se unen a oligomanósidos de microorganismos infecciosos induciendo la activación (Drickamer & Taylor, 1993), además las MBP solubles funcionan como opsoninas. A las selectinas, se les ha atribuido funciones de mediadoras en el fenómeno de la adhesión de leucocitos circulantes a vasos sanguíneos, además de estar involucradas en la recirculación de linfocitos a los nódulos linfoides periféricos,

**Tabla 1.** Clasificación de las lectinas animales

Grupo de lectinas	Características del grupo	Representantes	Estructuras o azúcares reconocidos
<b>Lectinas con secuencia conocida</b>			
Tipo C	Secuencia homóloga en el CRD*	Selectinas, Colectinas	Muy variable
Tipos S	Secuencia homóloga en el CRD, dependencia de grupos tioles en su estructura	Galectinas	$\beta$ -galactosidos y poli-N-acetyl-lactosaminas
Tipo P	Región repetida única	Receptor de manosa 6-fosfato	Man-6-P o N-glicanos ricos en manosa
Tipo I	Dominio tipo inmunoglobulina	Lectinas de la superfamilia de Inmunoglobulinas (siglec), calnexina, calreticulina	Principalmente ácido siálico
Proteínas de unión a hialuronato	Secuencia homóloga en el CRD	CD 44, agregano	Cadenas de hialurónico
Lectinas de huevos de rana	Secuencia homóloga		Galactosa, ácido siálico, heparinas
<b>Lectinas no secuenciadas</b>			
Pentraxinas	Arreglo en subunidades pentaméricas		Variable
Proteínas de unión a glicosaminglicanos	Grupos de aminoácidos básicos		Glicosaminglicanos
Proteínas de unión a gangliosidos	Sin información		Glicolípidos sialilados
Interleucinas I y II	Sin información		Oligosacáridos ricos en manosa
Lectinas de hemolinfa de insectos	Sin información		Ácido siálico

\*CRD, sitio de reconocimiento al carbohidrato (por sus siglas en inglés).

Modificado de Varki, 1999.

otras son activadas por mediadores inflamatorios (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, otras lectinas están involucradas en la biosíntesis, distribución, tráfico y conducción de glicoproteínas a la superficie celular, como la calreticulina que se une temporalmente a la glucosa terminal de unidades de oligosacaridos nuevos, controlando el ensamble y plegamiento de las glicoproteínas (Spiro, *et al.*, 1996).

*Lectinas de invertebrados:* Se cuenta con resultados que demuestran la presencia de lectinas en las membranas de células sanguíneas o hemocitos (Sierra *et al.*, 1998). Una de las funciones de estos grupos celulares en los invertebrados, es el reconocimiento de elementos no propios, los cuales serían eliminados por fagocitosis, este aspecto es interesante debido a que se podría considerar que en los hemocitos, las lectinas estarían funcionando como elementos de reconocimiento específico, aunque primitivo, para la protección inmune del langostino. La presencia de lectinas en los crustáceos se ha puesto en evidencia por una serie de reportes, uno de los primeros, el de Cantacuzene en 1912 (Sharon & Lis, 1987). Se propone que estas moléculas realizan funciones muy importantes en invertebrados, aunque hasta ahora no se conocen con exactitud, pero a ciencia cierta representan la primer barrera específica de protección contra organismos depredadores (Arason, 1996; Muta & Iwanaga, 1996); en los embriones de la cucaracha de mar *Tachypleus gigas* (Shishikura & Sekiguchi, 1984) protegen al huevo contra patógenos, y en otros organismos se les asocia con el transporte, inmovilización y almacenamiento de carbohidratos (Mauchamp, 1982).

La actividad aglutinante hacia eritrocitos, característica de muchas lectinas, está presente en la hemolinfa de diversos organismos invertebrados (Shishikura & Sekiguchi, 1984; Baldo *et al.*, 1978; Cohen, 1968; Hall & Rowlands, 1974; Johnson, 1964); en determinados casos, es específica para eritrocitos de alguna especie o grupo sanguíneo en particular. En 1966, Uhlenbruck y Prokop, reportaron la existencia de una aglutinina en el caracol de jardín *Helix sp.*, específica para eritrocitos humanos tipo A. El determinante de grupo sanguíneo en estos eritrocitos es GalNAc que se encuentra en posición terminal no reductora (Viele *et al.*, 1997), por lo que este azúcar es específico en la inhibición de la hemaglutinación por hemolinfa del caracol. Entre las lectinas purificadas y caracterizadas en invertebrados, se encuentran la de la cacrola de mar *Limulus polyphemus* (Marchalonis & Edelman, 1968), la de la cucaracha de mar *Carcinoscorpius rotunda cauda* (Mohan *et al.*, 1982), la de la almeja *Tridacna maxima* (Baldo *et al.*, 1978) y la de la babosa *Limax flavus* (Miller, 1987).



*Lectinas de crustáceos:* En los crustáceos decápodos se han identificado lectinas con especificidad común por carbohidratos N-acetilados como GlcNAc, GalNAc y NeuAc, que sugiere la presencia de un dominio de reconocimiento conservado (Amirante & Basso, 1984; Cohen, 1968; Freire-Márquez & Barracco, 2000; Hall & Rowlands, 1974; Hall & Wang, 1974; Kopacek *et al.*, 1993; Ravindranath *et al.*, 1985; Toda *et al.*, 1998; Umetsu *et al.*, 1991; Vasta & Cohen, 1984), así, en la hemolinfa del cangrejo *Cancer antennarius* (Ravindranath *et al.*, 1985) se ha reportado una lectina específica para los derivados de ácido siálico 9-O- y 4-O-acetilado; en el suero del cangrejo cocotero *Birgus latro*, algunas lectinas son específicas para ácido siálico (Vasta & Cohen, 1984). En los crustáceos decápodos, las lectinas identificadas y/o caracterizadas se encuentran en las siguientes especies: *Homarus americanus*, (Hall & Rowlands, 1974; Hall & Wang, 1974), *Peneus japonicus*, *P. californiensis*, *P. monodon* y *P. schimitti* (Freire-Márquez & Barracco, 2000), todas ellas con especificidad para ácido siálico. Vasta *et al.*, (1983) identificaron en la hemolinfa del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii*, actividad hemaglutinante susceptible de inhibirse con varios carbohidratos, lo que muy probablemente nos indique la existencia de varias lectinas. No abundan los ejemplos de lectinas de este grupo a las que se les haya determinado su estructura primaria y secundaria, solo existe un reporte relacionado con la secuenciación de una lectina, procedente de *Megabalanus rosa*, realizada por técnicas de biología molecular por el gen que la codifica (Takamatsu *et al.*, 1994). La secuencia de aminoácidos de la lectina del *M. rosenbergii*, determinada por espectrometría de masas, muestra 40% de homología con las cadenas ligeras de las moléculas de anticuerpos (Zenteno *et al.*, 2000<sup>b</sup>). La organización de la estructura tridimensional de estas proteínas se desconoce debido principalmente a su alta tendencia a la agregación (Vasta, 1992).

*La lectina del langostino M. rosenbergii:* En la hemolinfa del langostino se identificó una lectina (MrL), con capacidad para aglutinar específicamente eritrocitos de rata y conejo (Vázquez *et al.*, 1993), cuando estos eritrocitos son tratados con neuraminidasa, se inhibe la capacidad para ser aglutinados, además se identificó mediante ensayos de inhibición de la actividad aglutinante con

carbohidratos, que MrL es específica por ácido siálico, GlcNAc y GalNAc. La función aglutinante es dependiente de cationes divalentes como  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . La lectina podría tener funciones en el sistema inmune del crustáceo en el reconocimiento de material extraño, debido a su capacidad para 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 mecanismos de defensa o como opsonina en la fagocitosis de material extraño al langostino, y muy posiblemente algún proceso de la regulación endocrina del organismo podría modificar su función, según el estadio de maduración del organismo. Se ha comprobado que en los hemocitos granulares circulantes se encuentra el sitio de síntesis de la lectina, ya que estudios ultraestructurales, con anticuerpos policlonales específicos a la lectina purificada (MrL) permitió identificarla en el complejo de Golgi, en gránulos de secreción y en la membrana celular de estas células (Sierra *et al.*, 1998), en donde se encuentra asociada a 2 componentes de la membrana con pesos moleculares de 68 y 72 kDa (Vázquez *et al.*, 1997), por lo que se considera que estas células promueven la fagocitosis.

Recientemente se han identificado isoformas de la lectina de juveniles de *M. rosenbergii*, lo que permite especular que la función de esta lectina en la etapa juvenil estaría relacionada con el transporte de carbohidratos encargados de formar la quitina (polímero de GlcNAc), (Zenteno *et al.*, 2000<sup>a</sup>).

## **JUSTIFICACIÓN**

*Macrobrachium rosenbergii*, es un decápodo de agua dulce de gran interés comercial a nivel nacional. A pesar de que es de fácil adaptación al cultivo, los organismos larvarios y juveniles son altamente propensos a adquirir infecciones (Cheng & Chen, 2000<sup>a</sup>, Cheng & Chen, 2000<sup>b</sup>), lo que permite suponer que algunos mecanismos de defensa se encuentran disminuidos en estos estadios de desarrollo. La inmunidad es un mecanismo de defensa que se activa específicamente en un organismo ante la presencia de agentes patógenos o de moléculas extrañas. Los mecanismos de defensa en crustáceos están dados por la cooperación de mecanismos humorales y celulares (Lee & Söderhäll, 2002; Söderhäll & Smith, 1986; Thornqvist *et al.*, 1994), 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. En estudios previos se identificó en la hemolinfa y en la membrana celular de hemocitos circulantes del langostino malayo *M. rosenbergii*, una lectina específica para ácido siálico, aun cuando se proponen varias funciones para la lectina, es posible considerarla como indicador de la actividad de la respuesta inmune en el langostino, en condiciones de estrés (por contaminantes, estrés salino, etc.) o como respuesta ante alguna enfermedad o infección.

## **OBJETIVOS**

- Caracterizar bioquímicamente a la lectina serica del langostino *Macrobrachium rosenbergii*.
- Determinar la participación de la lectina en los mecanismos de defensa del langostino.

## **HIPOTESIS**

La lectina tiene una función dual en el ciclo de vida del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, en organismos juveniles participa en el transporte de azúcares mientras que en organismos adultos, tanto la lectina soluble como la de membrana, activan mecanismos efectores de la respuesta inmune, compartiendo algunas características, como la especificidad y tener epítopos comunes. Ambas lectinas presentan diferentes mecanismos de activación y regulación.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Organismos**

Los langostinos (*M. rosenbergii*) se colectaron en la granja acuícola "El Higuierón", en Jojutla, Morelos, México, donde se cultivan 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  $7 \pm 0.5$  cm de longitud, Juvenil II de  $9.1 \pm 0.8$  cm de longitud; Adulto I fueron los organismos en intermuda de  $10.3 \pm 0.9$  cm y Adultos II de  $11.9 \pm 1$  cm de longitud.

### **Purificación de lectina**

La hemolinfa se obtuvo de la zona pericárdica del langostino usando una jeringa (de insulina para los juveniles y de 3 ml para los adultos) 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, CaCl<sub>2</sub> 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, inmovilizado físicamente en Sephadex G-25 mediano (Pharmacia Chemicals, Uppsala Sweden). El estroma de eritrocitos fue tratado con gluteraldehído al 1.5% antes de su purificación, según el método descrito por Vázquez *et al.*, (1993). Se aplicaron 400 µl de hemolinfa a una columna previamente equilibrada con TBS con un flujo de 10 ml/h. La columna se lavó con TBS; la lectina se eluyó con ácido acético (A. A.) al 3% y se neutralizaron las fracciones colectadas a pH de 6.0 con NaOH 1M. A cada fracción 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 se concentraron por ultrafiltración en una cámara de Amicon (Amicon Colexington, Mass.) utilizando membranas PM/10 (límite de filtración de 10 kDa). La lectina se conservó a -70°C hasta su uso.

## **Caracterización química de la lectina MrL**

### ***Procedimientos analíticos***

Para la determinación de la concentración de proteína en la hemolinfa, la lectina pura e isoformas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La composición de aminoácidos se determinó con 100 µg de lectina purificada en 30 µl 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 de *M. rosenbergii* e isoformas se realizó por cromatografía de gases con derivados alditos trifluoroacetilados: se hidrolizaron 50 µg de lectina en 1 ml de metanol/HCl 0.5 N durante 24 h a 100°C, posteriormente a los derivados trifluoro-acetil-aditoses se les añadió 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-aditoses 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 (Sigma Chem., St. Louis, MO).

### ***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 por electroforesis de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Las muestras conteniendo entre 10 y 75 µg/ml se diluyeron 1:2 en amortiguador para muestra (Tris-HCl 75 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-MSH 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8), y se sometieron a ebullición en baño seco por 10 min. Se utilizaron estándares de peso molecular conocido, se tiñieron con azul de Coomassie (Sigma). 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 determinaron los R<sub>f</sub> de los

estándares con la fórmula:  $R_f = \text{distancia de migración de la proteína} / \text{distancia de migración del colorante}$ . Los pesos moleculares de la lectina se calcularon en la gráfica de PM vs.  $R_f$ , de los estándares por interpolación de los valores de  $R_f$  de la lectina.

### **Análisis de la secuencia del amino terminal**

La secuencia de aminoácidos de la lectina se realizó de la siguiente manera (Findlay *et al.*, 1989): la lectina se resolvió por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), el gel resultante se transfirió a papel de polidivinil sulfona (PVDF). Previo a la secuenciación, se retiró un carril con la lectina para su detección por inmunoelectrotransferencia con anticuerpos anti lectina. La secuenciación se realizó por el método de degradación del amino-terminal de Edman, en un secuenciador de fase gaseosa modelo Porton-Beckman LF-3000.

### **Anticuerpos monoclonales**

Para la obtención de anticuerpos monoclonales contra la lectina de *M. rosenbergii* (MrL), se siguió el método propuesto por Köhler & Milstein (1975) con 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  $\mu\text{g}$  de MrL en Adyuvante Completo de Freund (Gibco Laboratories Inc., Grand Island, N.Y.; 1:1, relación v:v) por vía intraperitoneal (IP), se realizaron otras 4 inmunizaciones IP con 50  $\mu\text{g}$  semanalmente durante 1 mes, (ver tabla 2). Tres días después del último reto, los ratones se sangraron del plexo retroorbital y se determinó por ELISA el título de los sueros (Engvall & Perlmann, 1971). Con el bazo del ratón que presentó mayor título contra (MrL), se procedió a efectuar la fusión celular para la obtención de hibridomas.

*ELISA:* la lectina se diluyó con amortiguador de carbonatos (0.1 M pH 9.6) a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos (Nunc, Naperville, IL.) con 100  $\mu\text{l}$  del antígeno y se incubaron por 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, al día siguiente, después de seis lavadas con PBS (0.1M,

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

Día	MrL pura	Vía de inmunización *
0	70 µg	I. P.
7	50 µg	I. P.
15	50 µg	I. P.
21	50 µg	I. P.
30	50 µg	I. P.
33	Sangrado del ratón y probar el suero por ELISA.	

\* I. P. Intra Peritoneal.

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

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 antisuero de ratón contra la lectina, en diferentes diluciones por 90 min a 37°C, se lavó 6 veces con PBS-T y se incubó 90 min a 37°C con el conjugado anti-ratón 1:1000 (Sigma, St Louis Mo.; anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa), las placas se lavaron y revelaron con el sustrato para peroxidasa 100 µl/pozo (OPD 0.04 % y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M pH 5) a temperatura ambiente en la oscuridad (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 la suspensión de células de bazo:* en condiciones estériles, se removió el bazo del ratón inmunizado, (el de mayor título de anticuerpos) se disgregó y lavó recuperando las células a través de una malla con medio DMEM sin complementos, se centrifugó a 300 g durante 10 min a 4°C; se contaron las células en un hemocitómetro y se comprobó la viabilidad.

*Preparación de células de mieloma:* Las células de mieloma murino P3-x63-Ag8 (Ag8) se mantuvieron en medio DMEM con SFB al 10% (v/v), previamente a



la fusión, se separaron las células de la botella y se lavaron por centrifugación con DMEM a 300 g, 10 min a 4°C, se contaron en hemocitómetro.

*Fusión celular.* En un tubo de 50 ml se mezclaron las células de bazo y de mieloma en relación 10:1 (linfocitos:mieloma), se centrifugaron a 300 g/10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y al paquete celular resuspendido suavemente, se le agregó 0.1 ml de polietilenglicol-4000 (Gibco), por cada  $10^6$  células, se resuspendieron con suavidad por 45 s, se añadieron 5 ml de medio, agitándose por 5 min más, se ajusta el volumen a 10 ml con DMEM- 20%, el paquete celular se resuspendió y se colocaron las células ya mezcladas en placas de cultivo de 96 pozos (50  $\mu$ l /pozo), previamente recubiertas con macrófagos peritoneales como células alimentadoras, se incubaron a 37°C con atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> 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), se prosiguió así durante 14 días, luego se cambió a medio HT (Hipoxantina 10 mM y Timidina 1.6 mM en medio DMEM - 20%, Sigma) donde permanecen por 7 días más, por último, se adicionó medio DMEM-20% (medio permanente), las placas se revisaron diariamente en microscopio invertido (Olympus IMT-2) hasta que se observaron colonias de híbridos. Se seleccionaron para clonarse los híbridos con mayor reactividad inmunológica, midiendo en los sobrenadantes por ELISA los anticuerpos producidos.

*Clonación de híbridos:* Los híbridos con mayores títulos se clonaron por el método de dilución limitante en presencia de macrófagos peritoneales, como células alimentadoras. Los híbridos se contaron y diluyeron hasta obtener una suspensión celular con concentración de 20 células/ml, se depositaron 50  $\mu$ l de la suspensión anterior en cada pozo y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, los pozos con solo una colonia se expandieron a botellas, posteriormente se les determinó el título de anticuerpos por ELISA y se reclonaron hasta obtener un solo isotipo en la identificación (alrededor de 4 clonaciones), monitoreando y seleccionando en cada ocasión la clona con el mejor título.

*Caracterización de los anticuerpos monoclonales:* Para la determinación de isotipos y subclases de los anticuerpos monoclonales, se utilizó un kit ELISA (Bio

Rad, Hercules Ca.): se fijó al antígeno a la placa de poliestireno (Nunc) 100 µl/pozo (100 µg/ml en amortiguador de carbonatos), se incubó 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, se repitió el lavado, se añadieron 100 µl de sobrenadantes (con los anticuerpos monoclonales) y se incubaron 1h a 37°C y toda la noche a 4°C, posteriormente se lavaron e incubaron 1h a 37°C con 100 µl de anticuerpos de conejo anti-isotipos de ratón (IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b IgG3, IgA, cadena λ y cadena κ de ratón) (Bio Rad), enseguida se lavaron tres veces con PBS-T. Se agregaron 100 µl del conjugado anti conejo acoplado a peroxidasa y se incubó 1 h 37°, se repitió el lavado con PBS-T y se reveló con 100 µl del sustrato, incubando a temperatura ambiente en oscuridad por un máximo de 30 min, la reacción se detuvo añadiendo 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 inyectaron las células híbridas intraperitonealmente (10<sup>6</sup> células híbridas/ml) con pristano (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano, Sigma) en proporción 1:1 suspensión celular:pristano, máximo 0.5 ml/ratón. El líquido de ascitis se recolectó después de la formación de tumor ascítico y se almacenó a -20°C hasta su uso.

#### ***Determinación de la concentración de lectina en diferentes estadios del langostino M. rosenbergii.***

Para determinar la concentración de lectina se utilizó el anticuerpo monoclonal 3G1 (AcM 3G1), acoplado a peroxidasa según el método descrito por Avrameas & Ternyck (1971); se activaron 10 mg de peroxidasa de rábano fuerte tipo VI (Sigma) con 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 fosfatos, pH 7.4. Se mezcló la enzima activada con 1 ml de AcM 3G1 (5 mg/ml) previamente dializado contra NaCl 0.15 M se mantuvo 24 h a 4°C. Finalmente se agregó 0.1 ml de L-lisina 1 M e incubó por 2 h y se dializó contra PBS toda la noche.

Una vez acoplado el AcM 3G1 a peroxidasa (AcM 3G1-P), se procedió a titularlo por ELISA (tablero de ajedrez) de la siguiente manera: en placa de poliestireno se fijaron concentraciones crecientes de lectina por columna horizontal, 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 diferentes diluciones del AcM 3G1 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M pH 5.5) 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 aproximadamente 1 (dilución 1:400).

Para la determinación de la concentración de lectina en la hemolinfa de langostinos de diferentes estadios, se realizó una curva estándar con concentraciones crecientes de lectina purificada tanto de organismos adultos como juveniles (Agundis *et al.*, 2000), la lectina se fijó en una placa de poliestireno (Nunc), en amortiguador de carbonatos 0.1 M (pH 9.6) e incubó 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 AcM 3G1-P (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.004 % en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5) a temperatura ambiente en oscuridad (como máximo 30 min), la reacción se detuvo con la adición de 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 la concentración creciente de la lectina en el eje de las ordenadas y en el de las abscisas la D.O. promedio de cada una de las concentraciones ensayadas. Se muestran los datos ± desviación estándar

La determinación del contenido de lectina en las hemolinfas de los diferentes estadios se realizó también por ELISA, de la siguiente manera: en

placas de poliestireno (Nunc) para ELISA, se fijó la hemolinfa en amortiguador de carbonatos 0.1 M, (pH 9.6, dilución 1:80) e incubó 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C, para el resto de la determinación se procedió de igual forma a lo descrito previamente para la elaboración de la curva estándar. Para calcular la concentración de la lectina en la hemolinfa se interpolaron el promedio de los valores de D.O. en la curva estándar.

### ***Inmunoelectrotransferencia***

Se empleó el método descrito por Towbin *et al.*, (1979). Posterior a la electroforesis se retiraron los geles e incubaron por 1 h 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 Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio Rad) durante 1h a temperatura ambiente, y voltaje constante (25V), con amortiguador de transferencia. La membrana de nitrocelulosa transferida se incubó por 90 min. con leche descremada al 5% en PBS para bloquear los sitios reactivos libres. Se añadió el sobrenadante de cultivo (conteniendo los anticuerpos monoclonales), e incubó 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. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron con PBS-Tween 4 veces, por 10 min cada lavado y dos más con PBS. Se reveló con el sustrato (4-cloro-1-naftol 0.05%, metanol 20%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 de la estructura secundaria por dicroísmo circular***

Por dicroísmo circular se evaluaron las modificaciones que pudiese presentar la lectina pura en presencia o ausencia de cationes divalentes. Para la eliminación de calcio se ensayaron tres agentes quelantes (Ácido etilendiaminoacético, EDTA; ácido etilenglicol bis (b aminoetileter) n'n'n'-tetracético, EGTA y ácido etilendinitrilotetracético, TT), los ensayos se realizaron de la siguiente manera: la lectina pura, en ácido acético 0.1M se incubó por 12

horas con c/u de los agentes quelantes a una concentración de 50 mM en ácido acético al 3 %, posteriormente se determinó la actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de rata. Las muestras tratadas con los diferentes agentes quelantes se sometieron a análisis de dicroísmo circular, las concentraciones de proteína fluctuaban entre 0.1 y 0.3 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0.01M, pH 7.2, el rango de detección fue de 190 a 240 nm en una celda de 5 mm de paso de luz. Los análisis se llevaron a cabo en el espectropolarímetro JASCO J-700 del Depto. de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, México.

### **Actividad hemaglutinante**

Se determinó la actividad aglutinante por doble dilución seriada, se utilizaron hemolinfas de langostinos de diferentes estadios, la hemaglutinación se realizó con eritrocitos de diferentes especies animales de la siguiente manera: en placas de microtitulación con fondo en "U" se colocaron, 25 µl de PBS/pozo, se agregaron 25 µl de la lectina o hemolinfa, diluyéndolo de forma seriada, posteriormente se añadieron 25 µl de eritrocitos al 2% en PBS, se incubó por 2h a temperatura ambiente y se tomó la lectura por observación directa. Los eritrocitos humanos (A, B, O) procedieron de donadores sanos, los eritrocitos animales del Bioterio 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 su uso. Los resultados se presentaron como actividad específica (título de la hemaglutinación/concentración de proteína), de acuerdo al método descrito por Vázquez *et al.*, (1993).

## **Participación de la lectina MrL en los mecanismos de defensa del langostino**

### **Preparación de células**

La hemolinfa, de organismos en estadio de intermuda (adulto I), se recolectó del seno pericárdico, usando una jeringa de 1 ml con solución anticoagulante para crustáceos (NaCl 0.45 M, glucosa 0.1 M, citrato de Na 30 mM, ácido cítrico 26 mM, EDTA 20 mM, pH 4.5) (Söderhäll & Smith, 1983). Los hemocitos se lavaron dos veces con solución de Van Harrevald (NaCl 0.2 M,

CaCl<sub>2</sub> 0.1M, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2 mM, pH 7.4) (van Harrevald, 1936) y se les determinó viabilidad celular por el método de exclusión con azul de tripan (viabilidad >90%)

### **Microscopia confocal**

Los hemocitos en solución o monocapa, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS (NaHPO<sub>4</sub> 0.015 M, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 18 µM, pH 7.4) por 3 h y se bloquearon por 30 min con albúmina al 5% libre de IgG (Sigma) en PBS. Los hemocitos fijados y bloqueados se lavaron con Triton X-100 al 0.2% (Sigma) en PBS (PBS-T) y se incubaron con MrL previamente acoplada con NSH-LC-biotina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Savage *et al.*, 1992) (MrL-Biotina; 3 µl o AcM 3G1 5 µl en PBS por 2h a 37°C). Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS y se incubaron con Extravidina-FITC 1:60 (Sigma), 1h a 37°C para MrL-Biotina, o con un conjugado anti-ratón acoplado a Lissamina-Rhodamina (Jackson Immune Res, Canada, 1:60) como anticuerpo secundario para el AcM 3G1. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se montaron en Vectashield (VECTOR Laboratories, Burlingame). Se observaron los hemocitos marcados en un microscopio invertido BioRad 1024 equipado con sistema de epi-iluminación y sistema confocal láser. En algunos experimentos, se comparó la marca de MrL (FITC) con la marca de AcM 3G1 (Rhodamina) y se contrastó con ioduro de propidio, colorante específico para ácidos nucleicos. Las imágenes se proyectaron y combinaron en la pantalla, usando verde para FITC y rojo para Lissamina-Rhodamina o ioduro de propidio. En la imagen combinada, el color amarillo se interpretó como co-localización de ambos fluorocromos. El porcentaje de hemocitos reconocidos por MrL o AcM 3G1 se determinó en 10 langostinos, contando tres campos diferentes con 100 hemocitos, cada uno. Los controles se realizaron incubando con mucina submaxilar bovina (10 µM) (Vazquez *et al.*, 1993). Otros ensayos incluían hemocitos (0.5 ml) tratados previamente con 0.1 U de sialidasa de *Clostridium perfringens* (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania) (Vazquez *et al.*, 1997).

### **Ensayos de fagocitosis in vitro**

Para los ensayos de fagocitosis se utilizaron eritrocitos de donadores humanos sanos o eritrocitos de diferentes especies animales, del bioterio de la

Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM, México. Los eritrocitos se marcaron con NBT (ver adelante), previamente a su uso se lavaron con PBS. Para obtener las monocapas de hemocitos se permitió su adhesión a placas de cultivo de 96 pozos (Falcon Plastics, NJ, USA) por 30 min a temperatura ambiente (25°C), las células no adheridas se eliminaron lavando los pozos con VSH. Los hemocitos de *M. rosenbergii* (300 células/pozo) se incubaron con eritrocitos en proporción 1:10 (h/e) a tiempos diferentes (1 a 60 min), y se tiñeron con colorante de Giemsa. La fagocitosis se observó por microscopia de contraste diferencial (objetivo X63). Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como índice fagocítico, que representa el porcentaje de hemocitos que fagocitaron cuando menos, un eritrocito (Maldonado *et al.*, 1994). Los ensayos de fagocitosis se realizaron también con eritrocitos tratados previamente con 1U de sialidasa de *C. perfringens* (Vazquez *et al.*, 1993).

#### **Determinación del estallido respiratorio**

Para el ensayo de la explosión oxidativa o estallido respiratorio se utilizaron monocapas de hemocitos y NBT-zymosan o una suspensión de NBT-eritrocitos; con este propósito se incubó NBT 0.2% (Sigma) en PBS con Zymosan-A 0.1% (Sigma) o con eritrocitos al 2% por 2h a 37°C. La monocapa de hemocitos, con número diferente de células/pozo ( $1-6 \times 10^5$  en VHS) se incubó con 100  $\mu$ l de NBT-Zymosan o NBT-eritrocitos. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS y metanol al 70%. Para solubilizar los depósitos de formazán, producidos por el  $O_2^-$  intracelular, se utilizaron 120  $\mu$ l de KOH 2M y 140  $\mu$ l de dimetil sulfoxido/pozo (Rook *et al.*, 1985). La coloración obtenida se leyó a 630 nm en un lector de ELISA (Labsystems, Multiskan MS, Finland), usando una solución de NBT-Zymosan como blanco. La reducción de NBT se reportó como nM de NBT reducido (NBTr)/monocapa, considerando que el coeficiente de extinción molar de NBTr es de 0.1 D.O.a 630 nm y representa 1.9 nM de  $O_2^-$  (Rojas *et al.*, 2001). Se investigó la influencia de MrL y el AcM 3G1 en el estallido respiratorio añadiéndolos en diferentes concentraciones a la monocapa de hemocito (0.1 a 10  $\mu$ g/ml y 0.5 a 50  $\mu$ g/ml respectivamente), el máximo efecto se observó en la adición simultánea de MrL y AcM 3G1, 10 min después del NBT-Zimosan. Los controles contenían PMA 10  $\mu$ g/ml (Rojas *et al.*, 2001). El estallido respiratorio de los hemocitos, se

determinó por observación directa de los depósitos de formazán; dos horas después de la incubación con NBT-Zymosan, para tal efecto, las células se fijaron con paraformaldehído al 4.5% en PBS y se observaron en un microscopio Olympus BH-2 de contraste de fases (objetivo 100x).

Como inhibidores del estallido respiratorio se utilizaron: la enzima superóxido dismutasa (SOD; Sigma), 50 - 300 U/μl; iodoacetamida (Sigma) 1 - 50 mM y piroxicam (Boehringer-Mannheim) de 1 a 5 mM. Estos inhibidores se añadieron a los hemocitos en volúmenes de 50 μl de VSH, 20 min después de la activación con MrL o AcM 3G1 (Muñoz *et al.*, 2000).

### **Especificidad de MrL**

La especificidad de la lectina en la actividad fagocítica y en el estallido respiratorio se determinó incubando la monocapa de hemocitos (10 min) con carbohidratos (100 mM), glicoproteínas o asialoglicoproteínas (0.1 μM) en TBS, previo a la adición de los eritrocitos. La eliminación del ácido siálico de la fetuina bovina y de la mucina submaxilar bovina se realizó por incubación con 10 mg de cada carbohidrato con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.02 N por 1h a 100°C (Spira & Bhoyroo, 1974). La especificidad del efecto inducido por MrL se confirmó utilizando la lectina, previamente incubada con 0.1 μM de mucina submaxilar bovina por 30 min a temperatura ambiente y adicionada posteriormente a la monocapa de hemocitos. La viabilidad celular de cada monocapa se determinó por el método de exclusión con azul tripan (viabilidad >90%).

### **Análisis estadístico**

Los resultados representan la media ± DS de los experimentos, realizados por triplicado. A los resultados se les aplicaron estadísticas paramétricas y no paramétricas usando el software Sigma Stat V 2.0 (Jandel Scientific, CA, USA) y las diferencias estadísticas en los resultados se consideraron como significativos con \*p<0.05 y \*\*p<0.025, en la comparación con los controles respectivos.

## **Regulación de la lectina MrL**

### **Purificación de agregados de lectina**

La purificación de los agregados de lectina sérica se realizó a partir de la hemolinfa de organismos adultos, de la siguiente manera: 500 μl de hemolinfa se



aplicaron a una columna de filtración en gel conteniendo Sephacryl S-200 HR (1.6 x 60 cm, Pharmacia, Uppsala, Sweden), previamente equilibrada con TBS y con un flujo de 0.5 ml/min, se colectaron fracciones de 1 ml, a cada una se le determinó densidad óptica (D.O.) a 280 nm, actividad aglutinante y concentración de lectina por ELISA (ver adelante). Se encontró lectina en las tres principales fracciones de la columna. Para su purificación por cromatografía de afinidad, se aplicaron cada una de las 3 fracciones en una columna (1.5 x 12.5 cm), con fetuina-agarosa (Vázquez *et al.*, 1993), previamente equilibrada con TBS a un flujo de 10 ml/min. (266 mg proteína/ 1.5 ml por fracción). El material no retenido la columna se eluyó con TBS hasta tener una absorbancia a 280 nm < 0.001. Posteriormente, la lectina se eluyó con ácido acético al 3%, el pH se llevó a 6.0 con NaOH 1M. A cada fracción colectada de 2 ml, se le determinó densidad óptica a 280 nm y actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de rata al 2 % en TBS. Las fracciones eluidas de la columna de afinidad se concentraron 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. Para los ensayos posteriores, se utilizaron las lectinas MrL-I y MrL-III, como representativas de la forma agregada y sin agregar.

#### **Determinación de isoformas de MrL**

Posterior a la purificación por cromatografía de afinidad se determinó la presencia de isoformas, en las fracciones (MrL-I y MrL-III). Se aplicó c/u de las fracciones a una columna aniónica mono P HR 5/20 mm. La columna fue equilibrada con amortiguador bis-tris (50 mM, pH 7.1), con flujo de 1 ml/min y presión máxima de 40 bars. Se utilizó el sistema FPLC. Para eluir las isoformas, se aplicó un gradiente de 0-1 M de cloruro de sodio, en el mismo amortiguador, colectándose fracciones de 1 ml, a cada una se le determinó densidad óptica a 280 nm.

#### **Perfil de péptidos**

El perfil peptídico de las lectinas MrLI y MrLIII se determinó por MALDI-TOF a partir de los fragmentos producidos por la digestión de las lectinas con tripsina. Las bandas obtenidas por separación electroforética (200 mM de proteína/banda) se hidrolizaron con 0.5 µg de tripsina (Promega grado secuenciación) en 500 µl de

bicarbonato de amonio pH 8, a 37°C por 24 h. Las muestras se prepararon mezclando directamente 1 µl del material digerido con 1 µl de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (12 mg/ml en acetonitrilo/agua, 80:20 v/v). Los iones positivos de los péptidos se midieron por MALDI-TOF en un espectrómetro de masas Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Germany), equipado con un láser de UV de 337 nm. El espectro de masas se obtuvo en modo reflectron con voltaje de 8keV de aceleración y detección positiva. Se utilizó tripsina sola como control para identificar los péptidos producidos por auto digestión y angiotensina I como estándar (Peso molecular 1296.7) (Hellman *et al.*, 1995). Las masas, de los péptidos ionizados [M+H] producidos por digestión triptica, se compararon entre MrL-I y MrL-III.

#### ***Cuantificación del contenido de lectina en las diferentes fracciones purificadas de la hemolinfa del langostino *M. rosenbergii****

La cuantificación se realizó de forma similar a la reportada para los diferentes estadios del langostino (Agundis *et al.*, 2000), se construyó una curva estándar con concentraciones crecientes de lectina pura de adulto, y por ELISA, se estimó el contenido de lectina de las diferentes fracciones purificadas de la hemolinfa fijándolas en la placa con amortiguador de carbonato, la D.O. resultante se interpoló en curva estandarizada para ese fin.

#### ***Estructura secundaria por dicroísmo circular***

Se determinó la estructura secundaria de las lectinas, MrLI y MrLIII, por dicroísmo circular, las lectinas se trabajaron a una concentración de 0.3 mg/ml en amortiguador de fosfatos 0.01M, pH 7.2, el rango de detección fue de 180 a 240 nm en una celda de 5 mm de paso de luz. Los análisis se efectuaron en el espectropolarímetro JASCO J-700 del Depto. de Bioquímica del Instituto de Química, UNAM, México.

#### ***Actividad hemaglutinante***

Se determinó la actividad aglutinante de las diferentes fracciones obtenidas en la purificación de la lectina y sus agregados por el método de doble dilución seriada (Vázquez *et al.*, 1993).

## **RESULTADOS**

### **Langostinos**

Dependiendo de los estadios de maduración los langostinos se clasificaron en cuatro grupos de crecimiento: juvenil I (post-larva), animales con  $7\pm 0.5$  cm de longitud, peso promedio de  $2.33\pm 0.7$ g, cuerpo translucido sin quelas desarrolladas; juvenil II de  $9.1\pm 0.8$  cm, peso  $5.7\pm 0.5$ g, cuerpo no translucido y quelas sin desarrollar aun; adulto I especímenes de intermuda de  $10.3\pm 0.9$  cm, peso de  $13.2\pm 1.5$  g, quelas en desarrollo y adulto II  $11.9\pm 1$  cm de longitud, cuerpo translucido exoesqueleto completo y peso promedio de  $17.3\pm 4$  gramos. Se obtuvieron hemolinfas de cada uno de los estadios del animal y se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Purificación de lectina de la hemolinfa del langostino *Macrobrachium rosenbergii***

La lectina fue purificada a partir del suero de los langostinos adultos I, en intermuda. Como se puede apreciar en la tabla 3 y figura 1, en el proceso de purificación, utilizando como matriz de afinidad estroma de rata tratada con gluteraldehído, la cantidad de lectina purificada, partiendo de una concentración de 100 mg de proteína total (1 ml de suero) fue de 0.014 mg; que representa el 50% de la actividad hemaglutinante con un incremento de 3,246 veces la actividad específica de la lectina con respecto al suero.

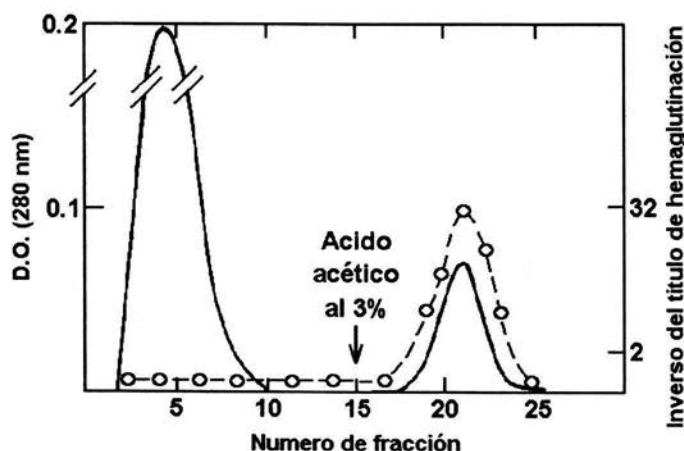
### **Anticuerpos monoclonales**

Los anticuerpos monoclonales se obtuvieron fusionando células de bazo de ratón hiperinmune con células de mieloma murino, se sembraron 5 placas, todas contenían híbridos, algunos de ellos presentaron actividad contra la lectina, posteriormente se realizó la clonación de las que presentarían mejor título y se reclonaron varias veces hasta garantizar la monoclonalidad, las clonas con mejores títulos fueron: 1A8, 1B10, 1F9, 1G1 y 2E12. Se seleccionó la clona BE3D6B3G1 con isotipo IgG1  $\kappa$ , para la producción de líquido de ascitis, se expandió en ratones BALB/c hembras (previamente tratados con pristano) por inyección intraperitoneal de la clona. Se obtuvieron 35 ml de ascitis, que se utilizaron en la caracterización de la lectina, el material se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**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) <sup>1</sup>
Suero	100	1280	12.8
Fracción N R	87	0	0
Lectina	0.014	640	45,714

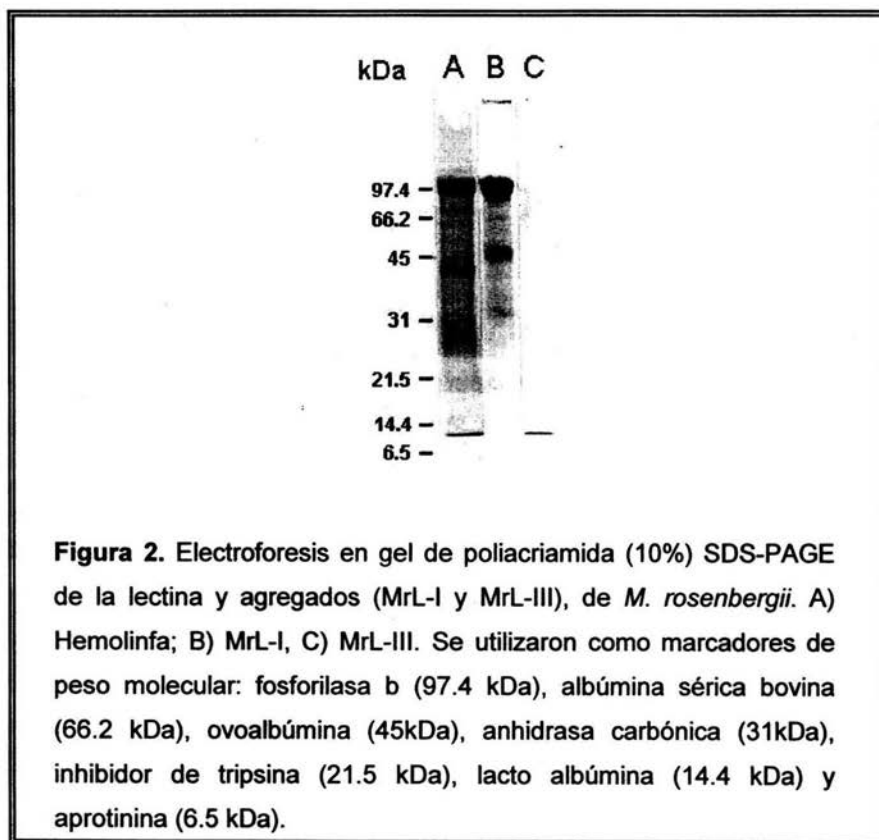
\*Unidades hemaglutinantes en presencia de una solución al 2% de eritrocitos de rata. <sup>1</sup> Actividad Especifica =UHA/mg de proteína.

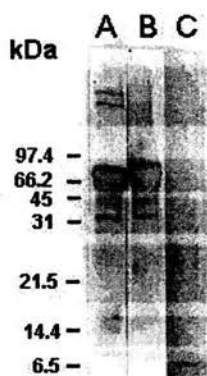


**Figura 1.** Perfil de elución de la lectina MrL purificada por cromatografía de afinidad con estroma de eritrocitos de rata-Sephadex G-25. Se aplicaron 400  $\mu$ l de hemolinfa de organismo adulto a una columna equilibrada con TBS pH 7.4 y a un flujo de 10 ml/h. A los tubos colectados (2 ml), se les determinó absorbancia a 280 nm y actividad hemaglutinante con eritrocitos de rata al 2 % en TBS. La fracción no retenida no presentó actividad aglutinante, la lectina se eluyó de la fracción retenida con A. A. al 3% (— D.O. de la fracción, —○— Inverso del título de hemaglutinación).

## Caracterización química de la lectina MrL

La lectina purificada del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, es una glicoproteína con peso molecular de 19 kDa, constituida por 2 subunidades, cada una con un peso de 9.6 kDa, determinado por electroforesis (SDS-PAGE) (Figura 2). Se demostró por inmunoelectrotransferencia que los anticuerpos monoclonales, dirigidos contra la lectina pura (19 kDa), reconocían la fracción de 9.6 kDa (Figura 3). Los aminoácidos que se encuentran en mayor proporción en la proteína son: glicina, serina, ácidos glutámico y aspártico, el contenido de metionina e histidina es bajo (Tabla 4). La fracción sacarídica de la lectina equivale a 7%, contiene: ácido NeuAc (N-acetil-neuramínico o ácido siálico), Gal, Man y (GlcNAc) (Tabla 5). Por degradación de Edman, de la lectina pura (MrL) se obtuvo una secuencia parcial, de seis aminoácidos (DVPL[L/A]).





**Figura 3.** Inmunoelectrotransferencia de la lectina y agregados (MrL-I y MrL-III) de *M. rosenbergii*. A) Hemolinf; B) MrL-I, C) MrL-III. Se utilizaron los mismos marcadores de peso molecular que para la SDS PAGE

**Tabla 4.** Composición de aminoácidos (%) de las lectinas MrL-I y MrL-III purificadas por cromatografía de afinidad.

Aminoácido	MrL-I	MrL-III
Ser	8.2	11.9
Gly	13.6	11.5
Glx	11.0	11.2
Asx	7.6	9.2
Ala	8.0	8.1
Leu	8.7	7.3
Lys	5.0	5.8
Val	6.6	5.2
Phe	4.8	4.9
Thr	4.5	4.7
Prol	5.8	4.6
His	4.5	4.6
Ile	4.5	3.7
Arg	3.9	3.5
Met	1.9	1.8
Tyr	1.1	1.6
Cys	0.3	0.3

**Tabla 5.** Composición de carbohidratos (%) de las lectinas MrL-I y MrL-III purificadas por cromatografía de afinidad.

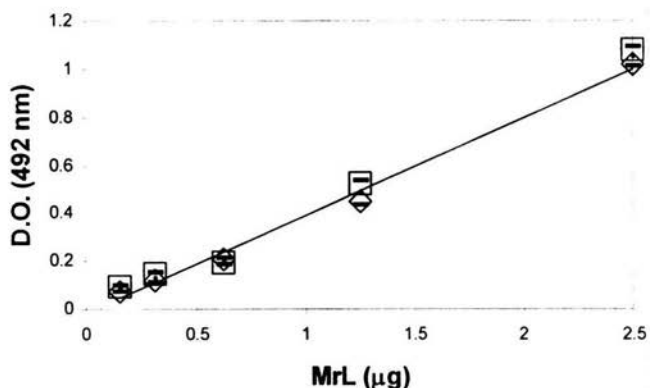
Carbohidrato	MrL-I	MrL-III
Man	33.3	36.4
Gal	29.6	30.9
GlcNac	22.2	10.9
GalNAc	11.1	16.4
NeuAc	3.7	5.5

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

La determinación de la concentración de lectina presente en las diferentes etapas de desarrollo del langostino se realizó por ELISA, para lo cual se estandarizó la curva de reconocimiento con lectina pura (organismos juvenil I y adulto I): se fijaron concentraciones crecientes de la lectina a la placa de ELISA, se utilizó el AcM 3G1 acoplado a peroxidasa, este método es de alta sensibilidad ya que es posible la detección de 30 ng/ml (1.5 fmol) de lectina (Figura 4). La cuantificación de lectina en la hemolinfa de langostinos de los 4 estadios nos proporcionó los siguientes resultados: etapa Juvenil I con la mayor concentración de lectina,  $2.5 \pm 0.4$  mg/ml, representa el 1.5% de la proteína total en la hemolinfa; etapa Juvenil II con concentraciones de  $1.8 \pm 0.3$  mg/ml; Adulto I y Adulto II con  $1.5 \pm 0.7$  mg/ml y  $1.9 \pm 0.4$  mg/ml respectivamente, lo que representa 0.7% y 0.5% del total de la proteína circulante en el organismo (Tabla 6).

***Estructura secundaria***

La estructura secundaria de la lectina se analizó por dicroísmo circular, con un máximo de absorción negativa entre 198-202 nm y de absorción positiva a 185 nm en la región lejana de UV. El análisis de la estructura secundaria del espectro,



**Figura 4.** Curva estándar para determinar concentración de MrL por ELISA. El eje "x" representa la cantidad de MrL de langostino adulto, (◇) y juvenil (□). El eje "y" la D.O: a 492 nm. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados representan el promedio de las D.O. Se muestran los datos  $\pm$  desviación estándar.

**Tabla 6.** Determinación de la concentración de lectina por ELISA, en la hemolinfa de *M. rosenbergii* en diferentes estadios de maduración.

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



realizado con el programa PROCEC 3.0, indica que la lectina pura tiene 23% de lamina- $\beta$  y 24% de  $\alpha$ -hélice.

De los ensayos de quelación con diferentes agentes, EGTA fue el, que eliminó la mayor cantidad de calcio abatiendo con ello la actividad específica. (Tabla 7). La modificación de la estructura secundaria inducida por quelantes, se analizó por dicroísmo circular; la estructura secundaria de las muestras tratadas con EDTA y EGTA, es similar con un 24% de  $\alpha$  hélice, 23% de hebra  $\beta$  mientras que el agente que provocó mayor cambio a la lectina fue TT (Tabla 8).

**Tabla 7.** Concentración de calcio en lectina de langostino adulto MrL.

Agente quelante	Concentración de Proteínas (mM)	Concentración de Ca <sup>++</sup> (mM)	AE*	Cantidad de Ca <sup>++</sup> /mol prot
Control	6.7	5.7	2.38	0.85
EDTA	9.19	2.5	1.74	0.27
EGTA	12.4	2.4	1.29	0.19
TT	5.7	2.6	1.4	0.46

\*AE, actividad específica

**Tabla 8.** Estructura secundaria (%) para MrL obtenida por dicroísmo circular (lectina tratada con diferentes agentes quelantes).

	Control	EDTA <sup>1</sup>	EGTA <sup>2</sup>	TT <sup>3</sup>
$\alpha$ hélice	24	24	24	21
Hebra $\beta$	23	23	23	26
No repetitiva	53	54	54	54

<sup>1</sup>EDTA, ácido etilendiaminoacético, <sup>2</sup>EGTA, ácido etilenglicol bis (b aminoetileter) n'n'n'n'- tetracético, <sup>3</sup>TT, ácido etilendinitilotetracético.

### Actividad hemaglutinante

La actividad hemaglutinante de la hemolinfa de los 4 estadios de desarrollo del langostino se determinó en presencia de eritrocitos: humanos tipo A, B, O, ratón, rata, gato, pollo, conejo y oveja (tabla 9). La mayor actividad aglutinante en la hemolinfa de los diferentes estadios, se presentó con eritrocitos de rata, conejo y pollo. El mayor título de la actividad hemaglutinante se identificó en la hemolinfa de organismos adultos en estado de internuda (Adulto I) y fue 3 veces mayor con eritrocitos de rata y conejo, y 4 veces mayor con eritrocitos de pollo, que la hemolinfa de postlarva (Juvenil I).

**Tabla 9.** Actividad hemaglutinante de la hemolinfa de *M. rosenbergii* 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 se expresan como la actividad específica, que representa el título de hemaglutinación/concentración de proteína (mg/ml). SA= sin actividad.

La especificidad de la lectina por azúcares, glicoproteínas o derivados desialilados se determinó por inhibición de la hemaglutinación. Los azúcares N-acetilados (GlcNAc, GalNAc y NeuAc), inhibieron la actividad en todos los estadios, aunque los organismos juveniles requirieron mayor concentración de azúcares (Tabla 10). De las glicoproteínas utilizadas, la fetuina resultó ser el inhibidor más potente, las demás glicoproteínas inhibieron en menor cantidad (IgA, mucina submaxilar bovina y porcina).

**Tabla 10.** Concentraciones mínimas ( $\mu\text{M}$ ) de azúcares y glicoproteínas que inhiben la actividad hemaglutinante de la hemolinfa de *M. rosenbergii*.

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
Fetuina	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 que inhiben 4 unidades de hemaglutinación de hemolinfa en presencia de eritrocitos de rata.

## Participación de la lectina MrL en los mecanismos de defensa del langostino

### Identificación de hemocitos con MrL y AcM-MrL

El número de hemocitos circulantes en la hemolinfa del langostino *M. rosenbergii* fue de  $6,400 \pm 2,500$  células/mm<sup>3</sup>. Los hemocitos reconocidos por

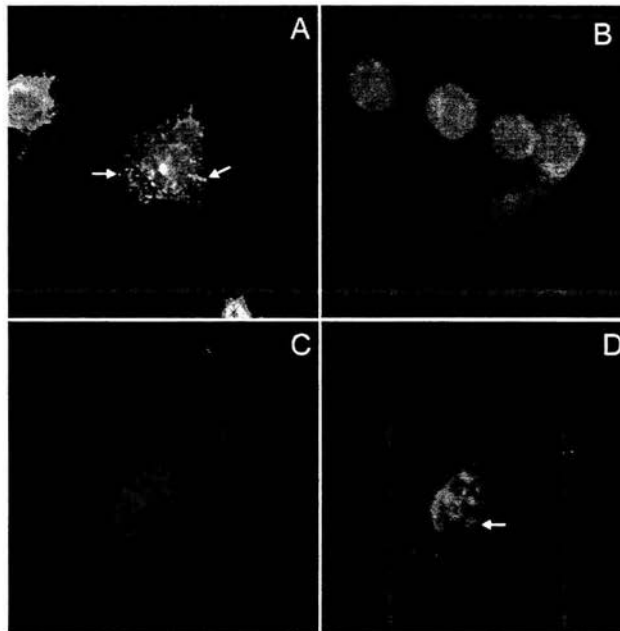
FITC-MrL y por AcM 3G1, determinado por microscopia confocal, corresponde al 5 y 8%, respectivamente, del total de hemocitos. Los hemocitos, que se adhirieron a los pozos de cultivo, describieron numerosos filipodios y pseudópodos (figura 5). La mayoría de los hemocitos (90%) que formaron la monocapa fueron positivos a MrL y AcM 3G1. Se identificaron receptores para AcM 3G1 distribuidos en la membrana celular y en los filipodios (figura 5A), los receptores reconocidos por MrL, solo se localizaron en la membrana celular (figura 5B). Se observó co-localización para los dos marcadores en la membrana celular, no en los filipodios (figuras 5C, 5D). El tratamiento previo de los hemocitos con sialidasa de *C. prefringens* eliminó la marca con MrL. Algunos ensayos de fluorescencia, se realizaron modificando la secuencia en la adición del AcM 3G1 o MrL, sin que se encontraran diferencias significativas en la distribución de la fluorescencia. En ensayos realizados con hemocitos no tratados con AcM 3G1 o tratados con MrL inhibida con mucina submaxilar bovina, no se observa marca de fluorescencia.

#### **Actividad fagocítica de hemocitos**

La actividad fagocítica (AF) de los hemocitos fue significativamente mayor en presencia de eritrocitos de pollo, rata, y conejo ( $p < 0.025$ ) que la actividad de los hemocitos tratados con zymosan o la fagocitosis de eritrocitos de humano ABO, caballo o cerdo. La AF contra eritrocitos desialilados no muestra diferencia significativa, cuando se compara con la fagocitosis de zymosan (tabla 11).

#### **Estallido respiratorio**

Para determinar el estallido respiratorio (ER) en monocapas de hemocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, se midió la producción de superóxido ( $O_2^-$ ), por reducción de NBT-Zymosan, con este propósito se utilizó PMA como activador. Después de 120 min de estimulación con PMA y en monocapas con  $1 \times 10^5$  hemocitos se consiguió la producción óptima de NBTr; se obtuvieron mayores cantidades de NBTr en hemocitos que fagocitaron eritrocitos de rata, pollo ( $p < 0.025$ ) y conejo ( $p < 0.05$ ), que en hemocitos que fagocitaron eritrocitos de otras especies o zymosan (tabla 11), el tratamiento con MrL (2.0  $\mu\text{g/ml}$ ), AcM 3G1 (20  $\mu\text{g/ml}$ ) o PMA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) incrementó la producción de NBTr en 4.7, 5.1 y 6.1 veces, respectivamente (figura 6), en comparación con hemocitos no estimulados.



**Figura 5.** Microscopia confocal de hemocitos de *M. rosenbergii* marcados con lectina sérica y AcM 3G1. Monocapas celulares marcadas con A) AcM-MrL-FITC; B) MrL-FITC, en ambas, se utilizó yoduro de propidio como marcador de contraste para el núcleo (en rojo). La marca con MrL y AcM-MrL se distribuyó en la membrana celular, el reconocimiento de AcM-MrL se observó también en los filipodios (flechas). C) los hemocitos observados en el canal rojo corresponden a AcM-MrL usando un anticuerpo secundario acoplado a Lissamina-Rhodamina y D) hemocitos marcados con MrL-FITC observados en el canal verde (60X).

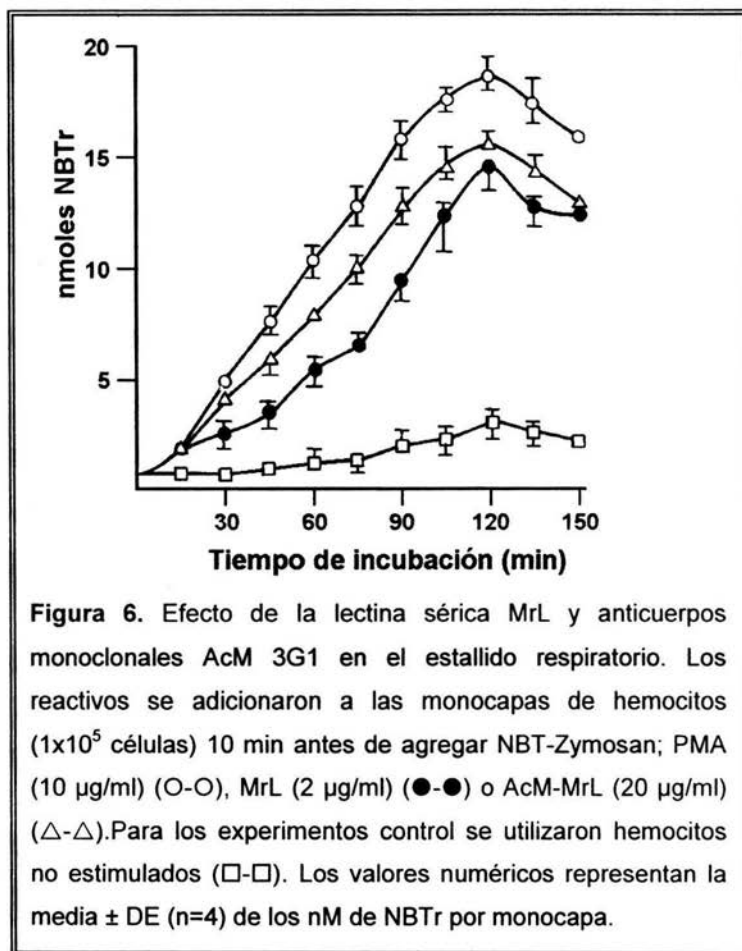
Cuando se adicionan ambas proteínas, MrL y AcM 3G1, el incremento en la producción de NBT<sup>r</sup> es de 5.7. Al utilizar anticuerpos comerciales, de isotipo IgG o IgM (20 µg/ml), no se incrementó significativamente la reducción del NBT en los hemocitos.

**Tabla 11.** Actividad fagocítica y reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) de hemocitos del langostino en presencia de eritrocitos.

Eritrocitos	Índice fagocítico <sup>1</sup> (%)	NBT <sup>2</sup> (nM)
Control (NBT-Zymosan)	17±5	3.2±1.6
Humano A,B,O	18±7	3.0±1.2
Rata	39±4**	16.6±4.1**
Asialo-Rata	19±1	3.7±1.3
Ratón	22±5	5.4±2.3
Asialo- Ratón	16±2	3.0±1.1
Conejo	29±8*	6.6±1.3*
Asialo- Conejo	20±4	4.7±2.3
Pollo	33±3**	9.8±3.2**
Asialo- Pollo	16±2	2.9±1.2
Caballo	18±3	3.6±1.1
Asialo- Caballo	17.9±3	3.3±1.3
Cerdo	18±3	3.5±0.5
Asialo- Cerdo	17± 2	3.1± 0.7

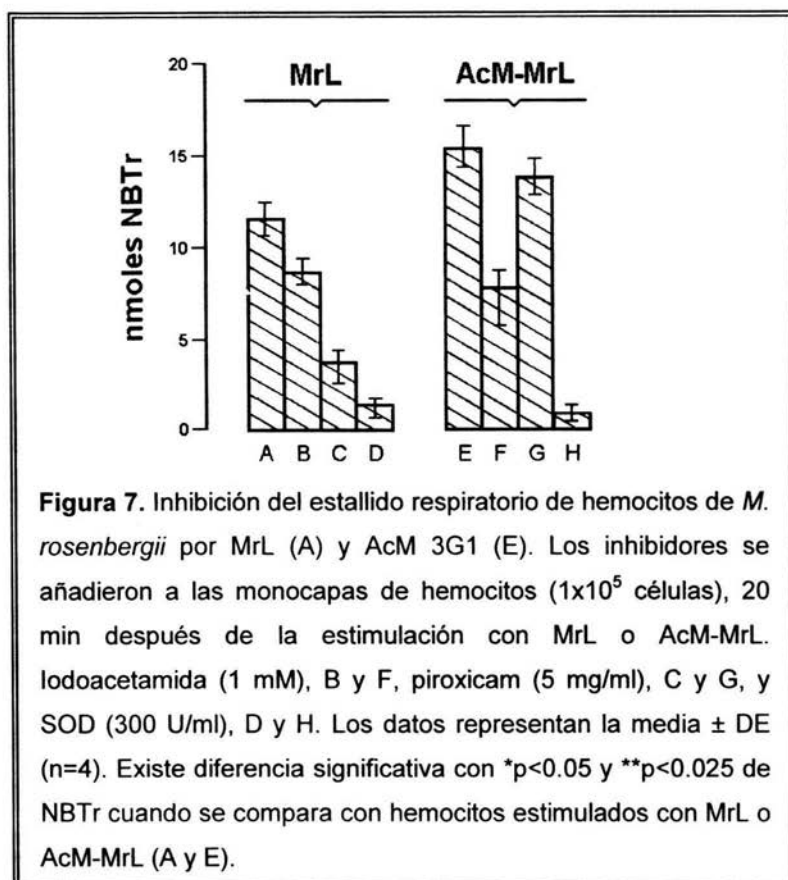
<sup>1</sup>Porcentaje de hemocitos que fagocitaron, cuando menos un NBT-eritrocito. <sup>2</sup>Estallido respiratorio expresado como nanomoles de NBT<sub>r</sub> por monocapa ( $1 \times 10^5$  células). Los valores representan la media±DE de 3 experimentos. Hay diferencia significativa con \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.025$ , determinada por la prueba U-Mann-Whitney, al comparar con NBT-Zymosan.

La reducción del NBT por el anión superóxido, se comprobó por ensayos citoquímicos con la presencia de depósitos de formazan en el citoplasma y vacuolas, que al igual que en los ensayos espectrofotométricos, los depósitos de formazan se incrementaron en los hemocitos tratados con PMA, MrL y AcM 3G1 en comparación con células no tratadas.



### ***Efecto de los inhibidores en el estallido respiratorio***

El efecto de inhibidores en la ER se observa en la figura 7, la iodoacetamida (5 mM) no afecta la actividad inducida por MrL, sin embargo, provoca un 68% de inhibición en la reducción de NBT en hemocitos tratados con AcM 3G1 ( $p < 0.05$ ). El piroxicam 5  $\mu\text{g/ml}$  disminuyó 75% de la reducción de NBT inducida por MrL ( $p < 0.05$ ), y no mostró efecto inhibitorio significativo en hemocitos estimulados con AcM 3G1. La enzima SOD (300 U/ml) disminuyó, en igual proporción, el efecto inducido por MrL o AcM 3G1 ( $p < 0.025$ ) (Figura 7).



### ***Efecto de azúcares y glicoproteínas en la fagocitosis de eritrocitos y en el estallido respiratorio***

La actividad fagocítica y efecto reductor del NBT, mostrado por los hemocitos hacia eritrocitos de rata, disminuyó en presencia de GlcNAc, GalNAc y Neu5Ac (100 mM), glicoproteínas sializadas como mucina submaxilar bovina y fetuina ó  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 sialil-lactosa, disminuyeron notablemente la fagocitosis y la capacidad de los hemocitos de reducir NBT (tabla 12). La  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, ovomucoide de gallina, asialofetuina y asialomucina submaxilar bovina, no modificaron la actividad fagocítica ni la actividad reductora de los hemocitos, en presencia de eritrocitos de rata. En ensayos con eritrocitos de pollo y conejo, los azúcares GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac  $\alpha$ 2,3 y  $\alpha$ 2,6 sialil-lactosa (100 mM) y las



proteínas mucina submaxilar bovina y fetuina (0.1 mM) redujeron significativamente la actividad fagocítica y NBT<sub>r</sub> de los hemocitos ( $p < 0.05$  para los azúcares y  $P < 0.025$  para proteínas). Estos inhibidores no afectaron la capacidad fagocítica o la reducción de NBT con eritrocitos de humano, ratón, cerdo o caballo. La capacidad de los hemocitos para reducir NBT en presencia de MrL se inhibió totalmente si se agregaba GlcNAc, GalNAc, Neu5Ac o Sialil-lactosa ( $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$ ) (100 mM). La producción de NBT<sub>r</sub> en hemocitos incubados con MrL se inhibió, con mucina submaxilar bovina y fetuina (0.1  $\mu$ M).

## **Regulación de la lectina MrL**

### ***Purificación de agregados de lectina***

De la hemolinfa purificada por cromatografía de filtración en Sephacryl S-200 HR, (100 mg de proteína total) se obtuvieron tres fracciones (Figura 8). La fracción Mr-I conteniendo proteínas de peso molecular superior a 200 kDa, (19.3% del total de la muestra); la fracción Mr-II que contenía proteínas de peso molecular comprendido entre 68 y 90 kDa, (34.8% del total de muestra) y la fracción Mr-III, con proteínas de bajo peso molecular, entre 18 y 20 kDa, (11.5% de la muestra) (figura 2). A las tres fracciones se les determinó actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de rata, Mr-III presentó el 75% de la actividad de la hemolinfa. Utilizando el método de ELISA con AcM 3G1 contra la lectina de 20 kDa, (descrito previamente), se identificaron diferentes concentraciones de proteína en las tres fracciones (Figura 8 y tabla 13), 0.4, 0.1 y 0.2 mg/100ml para, Mr-I, Mr-II y Mr-III respectivamente.

De las fracciones con mayor cantidad de lectina (Mr-I y Mr-III) se purificó la lectina por cromatografía de afinidad en fetuina-agarosa. El patrón de purificación por afinidad de Mr-I y Mr-III se puede ver en la figura 9. Mr-I, presenta 2 fracciones (D.O. a 280nm), la primera, eluída con TBS corresponde a la fracción no retenida, y la segunda eluída con acético al 3% a la lectina (MrL-I). Por ELISA, se cuantificó la concentración de lectina presente en ambas fracciones, los anticuerpos monoclonales 3G1 reconocen lectina en la fracción retenida pero no en la fracción no retenida, en ambas fracciones esta ausente la actividad hemaglutinante. Para

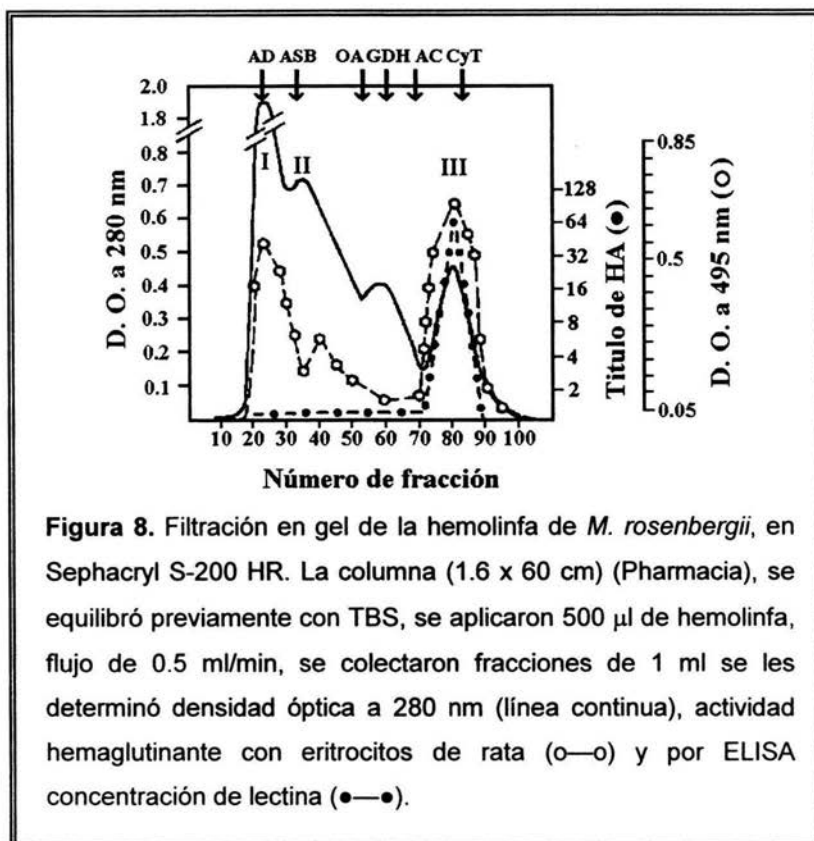
**Tabla 12.** Efecto de carbohidratos (100 mM) y glicoproteínas (0.1 M) en la actividad fagocítica de los hemocitos y, reducción de nitroazul de tetrazolium (NBT), en presencia de eritrocitos de rata.

Inhibidor	Índice fagocítico (%)	nM NBT <sub>r</sub>
Control	33±8	16.6
GlcNAc	27±4*	12.1*
GalNAc	28±5*	12.7*
Neu5Ac	23± 6*	5.7**
Neu5Ac $\alpha$ 2,3 lactosa	27±3*	5.5**
Neu5Ac $\alpha$ 2,6 lactosa	26±5*	7.0**
Mucina submaxilar bovina	16±4**	2.9**
Fetuina	15±4**	3.4**

Los hemocitos se incubaron con carbohidratos o glicoproteínas 10 min antes de adicionar los NBT-eritrocitos de rata. D-galactosa, D-manosa, D-glucosa y L-fucosa (100 mM),  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, IgG e IgM humana, ovoalbúmina, asialo-fetuina y asialo-mucina submaxilar bovina (0.1 M) no tuvieron efecto en la capacidad fagocítica o en la reducción de NBT. Se encontró diferencia significativa con \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.025$ , determinada por la prueba U-Mann-Whitney, al comparar con el control, (NBT-eritrocitos de rata sin inhibidor).

Mr-III, la DO a 280 nm también presenta 2 fracciones (figura 9), la primera fracción no retenida, eluida con TBS y la segunda eluida con ácido acético al 3% es la lectina (MrL-III), idéntica a la lectina purificada por afinidad con estroma de rata. Por ELISA, se determinó la concentración de lectina presente en ambas fracciones, los AcM 3G1 solo identifican lectina en la fracción retenida, que, además presentó actividad aglutinante.

En el proceso de purificación, utilizando como matriz de afinidad fetuina agarosa, la cantidad de lectina purificada fue de 0.1 mg para MrL-I y 0.05 mg para MrL-III (partiendo de 100 mg de proteína total). Con este procedimiento se recupera el 50% de la actividad hemaglutinante con un incremento de 459.8 la



actividad específica de la fracción MrL-III, en el caso de MrL-I, no se hizo esta relación por carecer de actividad aglutinante. La cantidad de la lectina pura representa el 0.7% del contenido de proteína en la hemolinfa del organismo adulto (Tabla 13). Finalmente, por cromatografía de intercambio aniónico, se identificaron dos isoformas en cantidades equimolares para MrL-I y una isoforma para MrL-III (Figura 10). Para la caracterización de las proteínas, se utilizó MrL-I y MrL-III como proteínas representantes de la lectina y de su agregado en la hemolinfa del langostino.

#### **Caracterización química de la lectina MrL-I**

Los agregados de lectina (MrL-I) son glicoproteínas, formadas por subunidades de 62.1 67.1 y 81.4 kDa, determinadas por SDS-PAGE (Figura 2). Por inmunoelectrotransferencia se demostró que los AcM 3G1, contra la lectina de

**Tabla 13.** Proceso de purificación de la lectina de *M. rosenbergii* (100 mg de proteína).

FRACCIÓN	PROTEÍNA (mg)	UHA <sup>a</sup>	ACTIVIDAD ESPECIFICA <sup>b</sup>
<b>Filtración en gel</b>			
Fracción I	19.31	NA	NA
Fracción II	34.8	NA	NA
Fracción III	11.5	192	16.7
<b>Cromatografía de afinidad</b>			
Fracción I NR	13.1	NA	NA
MrL-I	0.1	NA	NA
Fracción III NR	13.9	NA	NA
MrL-III	0.05	384	7680

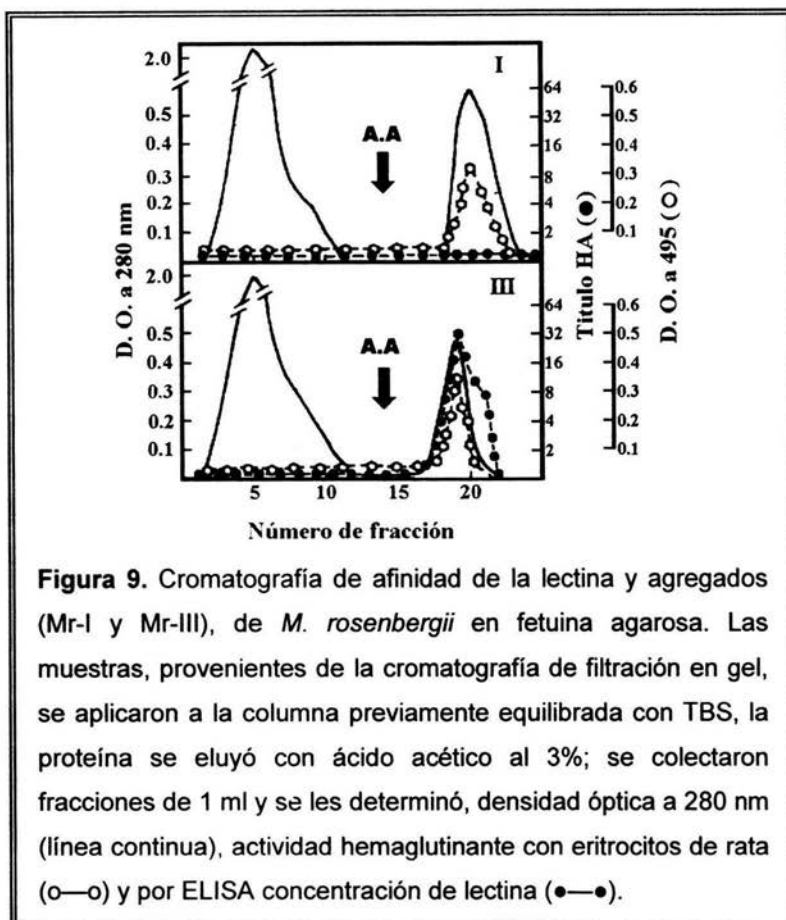
<sup>a</sup>UHA, unidades de hemaglutinación en presencia de eritrocitos de rata.

<sup>b</sup>UHA/concentración de proteínas. NA, sin actividad hemaglutinante.

19 kDa, reconocen a las proteínas agregadas de MrL-I (figura 3). MrL-I contiene los mismos aminoácidos y en proporciones similares que la lectina pura (Tabla 4), principalmente glicina, serina, ácido aspártico y ácido glutámico, y en menor proporción tirosina, metionina y arginina; MrL-I y MrL-III contienen residuos de cisteína. La fracción sacarídica en ambas lectinas la constituyen los mismos azúcares en diferente proporción; el 11% del peso molecular para MrL-I, mientras que para MrL-III es el 7%. Ambas contienen residuos de Gal y Man (Tabla 5); MrL-I tiene menor concentración de NeuAc que MrL-III. Estos resultados indican que la forma agregada de la lectina se encuentra sialilada en mayor proporción

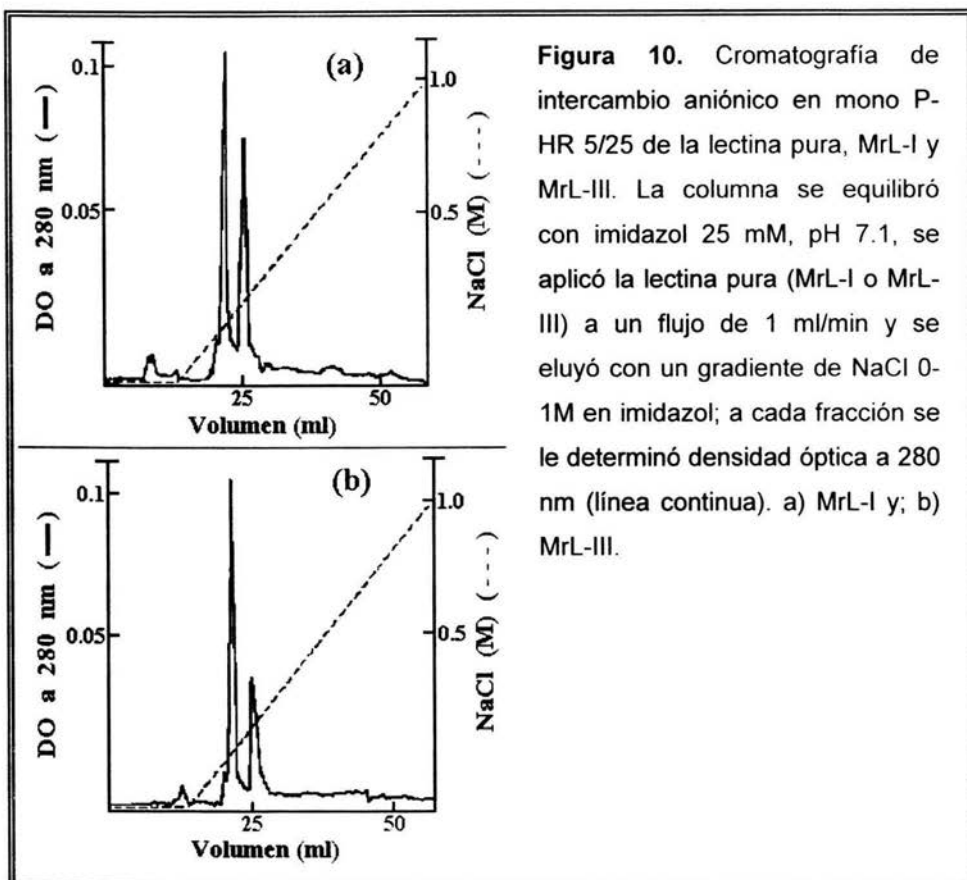
#### **Secuencia de aminoácidos y análisis del perfil de péptidos**

Se analizó la secuencia de aminoácidos de MrL-I por degradación de Edman, se obtuvo una secuencia de 12 aminoácidos (DVPLL/AXKQQD), para la



**Figura 9.** Cromatografía de afinidad de la lectina y agregados (Mr-I y Mr-III), de *M. rosenbergii* en fetuina agarosa. Las muestras, provenientes de la cromatografía de filtración en gel, se aplicaron a la columna previamente equilibrada con TBS, la proteína se eluyó con ácido acético al 3%; se colectaron fracciones de 1 ml y se les determinó, densidad óptica a 280 nm (línea continua), actividad hemaglutinante con eritrocitos de rata (o—o) y por ELISA concentración de lectina (●—●).

subunidad de 81.4 kDa de MrL-I; de las otras dos subunidades de ésta fracción, no se obtuvo ninguna secuencia, lo que pudiera indicar que estas proteínas tienen bloqueado el amino terminal. La secuencia de aminoácidos también se determinó por MALDI-TOF, previa a la digestión de la lectina (MrL-I, 84.1 kDa) por tratamiento enzimático. Se obtuvieron 31 péptidos para la subunidad MrL-I, para la lectina MrL-III se reportaron previamente 23 péptidos con masas comprendidas entre 635 y 3122 [M+H] (Zenteno *et al.*, 2000<sup>a</sup>). Las masas de los péptidos que resultaron comunes a ambas lectinas son 782.2, 804.9, 1110.6, 1278.8, 1891.4, y 2398.8. Estos péptidos guardan homología con un fragmento del receptor de



**Figura 10.** Cromatografía de intercambio aniónico en mono P-HR 5/25 de la lectina pura, MrL-I y MrL-III. La columna se equilibró con imidazol 25 mM, pH 7.1, se aplicó la lectina pura (MrL-I o MrL-III) a un flujo de 1 ml/min y se eluyó con un gradiente de NaCl 0-1M en imidazol; a cada fracción se le determinó densidad óptica a 280 nm (línea continua). a) MrL-I y; b) MrL-III.

células T de rata, región V-D-J de la cadena  $\beta$  y con la subunidad 6 de NADH deshidrogenasa del alga *Rhodomonas salina* (tabla 14).

### **Estructura secundaria**

Para determinar las diferencias de la estructura secundaria de MrL-I contra MrL-III, se sometieron al análisis de dicroísmo circular, en las mismas condiciones que se utilizaron para la lectina pura. El análisis del espectro de absorción, indica que la estructura secundaria de los agregados es igual a la de la lectina pura, 23% de lamina- $\beta$  y 24% de  $\alpha$ -hélice.

### **Actividad hemaglutinante**

La actividad aglutinante de la hemolinfa de *M. rosenbergii* y de las fracciones purificadas por cromatografía de filtración en gel y por cromatografía de

**Tabla 14.** Masas comunes de los péptidos tripticos obtenidos a partir de las lectinas MrL-I y MrL-III.

[M+H]*	Péptido	Procedencia
782.2	CASSGTGAE	Receptor de células T de rata, región V-D-J de la cadena $\beta$ (fragmento)
804.9		
1110.6	TQFIFKQAK	Subunidad 6 de NADH deshidrogenasa del alga <i>Rhodomonas salina</i> .
1278.8	KNFEASIQLTK	Subunidad 6 de NADH deshidrogenasa de <i>Rhodomonas salina</i> .
1891.4		
2398.8		

\*Masas monoisotópicas

afinidad (MrL-I y MrL-III), se determinó con eritrocitos de diferentes especies animales. Las fracciones Mr-I, Mr-II y la fracción MrL-I no tuvieron actividad hemaglutinante a concentraciones de 0.1 mg/ml. La hemolinfa, la fracción Mr-III y MrL-III, aglutinaron específicamente eritrocitos de rata, conejo y pollo, pero no eritrocitos de otras especies animales incluyendo eritrocitos humanos ABO. MrL-III aglutinó aún a concentraciones de 3  $\mu$ g/ml. La hemolinfa, fracción III y MrL-III no aglutinaron eritrocitos de rata, conejo y pollo, después del tratamiento con sialidasa de *Vibrio cholerae*. La actividad aglutinante de MrL-III se inhibió con 200 mM de GalNAc o 200 mM de NeuAc en PBS.

## DISCUSIÓN

### Caracterización química de la lectina MrL

En este trabajo se aisló a la lectina del langostino Malayo *Macrobrachium rosenbergii* y se realizaron diversos estudios para tratar de realizar una correlación estructura-función, para identificar mejor el papel de esta proteína en los procesos de defensa del langostino.

La lectina se purificó por cromatografía de afinidad en una columna con estroma de rata, con este procedimiento se incrementó la actividad específica de la lectina, de 12.8 UHA/mg en la hemolinfa, a 45,714 UHA/mg para la lectina pura, que representa un incremento de 3, 571 veces con respecto a la hemolinfa. El peso molecular de la lectina es de 9.6 kDa para el monómero, que concuerda con lo reportado previamente por Vázquez *et al.*, (1993). Dentro del grupo de crustáceos, se han identificado lectinas con pesos moleculares diversos, la de mayor tamaño es la lectina de *Liocarcinus depurator* de 700 kDa con subunidades de 38 kDa (Fragkiadakis & Stratakis, 1997) y la menor, la de *M. rosenbergii*, de 19 kDa con subunidades de 9.6 kDa (Vázquez *et al.*, 1993); la especificidad de estas lectinas esta dirigida a azúcares N-acetilados (NeuAc, GlcNAc y GalNAc), en particular, los crustáceos decápodos tienen especificidad por alguna variedad de ácido siálico, por ejemplo, la lectina de *C. antennarius* (Ravindranath *et al.*, 1985) hacia ácido 9-O/4-O acetilsialico. La caracterización de la lectina MrL, confirma lo reportado previamente por Vázquez *et al.*, (1993), es una glicoproteína, con 11% de azúcares, y un peso molecular de 19 kDa, los aminoácidos más abundantes son: glicina, serina, ácido glutámico y ácido aspártico, y en menor proporción metionina e histidina. La parte sacarídica esta compuesta por NeuAc, galactosa, manosa y GlcNAc. Esta lectina en comparación con otras lectinas de crustáceos decápodos es de bajo peso molecular, y al igual que ellas su especificidad por esta, está dirigida a azúcares N acetilados y ácido siálico, y aglutina eritrocitos de rata, conejo y pollo.

La caracterización parcial de la lectina de *M. rosenbergii* en los diferentes estadios de maduración del langostino, nos indica que la capacidad de aglutinación hacia eritrocitos de rata, conejo y pollo se mantiene en todos ellos así como la especificidad hacia ácido siálico y azúcares N-acetilados. Si la



especificidad de la lectina no es alterada por el estadio de desarrollo del langostino, es de suponer que el sitio de enlace a carbohidratos en estas proteínas se conserva durante la maduración.

En vertebrados, son bien conocidas las funciones de las lectinas; se han identificado lectinas que participan como proteínas de reconocimiento, activando la cascada del complemento (Vasta *et al.*, 1994) o bien las selectinas que funcionan como moléculas de adhesión a células endoteliales (Varki *et al.*, 1999). En invertebrados, se conoce poco de las funciones reales de las lectinas y todas ellas dentro del sistema inmune innato, se especula que funcionan como opsoninas, activando el sistema del complemento, a través de la vía de las lectinas, en equinodermos y procordados (Gross *et al.*, 1999), que activan el sistema de la proPO (Nappi & Ottaviani, 2000) y que funcionan como transportadoras de azúcares y glicoconjugados (Freire-Márquez & Barraco, 2000; Iwanaga, 2002). Según nuestros resultados, la lectina de organismos jóvenes requiere mayor concentración de azúcares que la de adultos para inhibir su actividad aglutinante, por lo que podemos suponer que la lectina en el estadio Juvenil I, posiblemente se utilice para llevar a cabo otras funciones como el transporte de azúcares. En esta etapa hay un movimiento constante de GlcNAc para la formación del exoesqueleto, constituido por polímeros de este azúcar, aunque no existe evidencia aun para explicar la menor actividad aglutinante de la lectina a pesar de que la concentración de lectina es mayor que la del adulto, la que además tiene mayor actividad biológica.

Los AcM 3G1 contra la lectina soluble MrL nos dieron ventajas que no se tenían con los policlonales; como la posibilidad de contar con anticuerpos homogéneos, de un solo isotipo en forma indefinida sin posterior estimulación antigénica, capaces de reconocer un solo epítipo del antígeno (una especificidad), además de los múltiples usos potenciales que puedan tener. En este trabajo se emplearon para cuantificar la lectina presente tanto en las fracciones provenientes de la purificación de los agregados como en la hemolinfa de los estadios de vida del langostino. Posterior a la fusión celular, se obtuvieron varias clonas, se trabajó con las que presentaron mayor capacidad de reconocimiento hacia la lectina MrL. Para asegurar la monoclonalidad de los hibridomas se realizaron 4 clonaciones.

Las clonas 1A8, 1B10, 1F9, 2E12 y 3G1 presentaron el mejor reconocimiento por la lectina. La clona 3G1 con isotipo IgG1  $\kappa$ , fue seleccionada para expandirla en ratón y obtener líquido de ascitis.

La cuantificación de la lectina en diferentes estadios es un estudio nuevo en invertebrados, hasta el momento además de nuestro trabajo, solo existe otro reporte que indica variaciones en la concentración de lectina entre dos estadios de desarrollo de la mariposa *Pieris brassicae* (Mauchamp & Hubert, 1984), que concuerda con nuestros resultados, donde reportamos: etapa Juvenil I, el 1.5% de la cantidad total de proteína en la hemolinfa corresponde a la lectina, etapa Juvenil II con 53% menos concentración de lectina en relación a Juvenil I. Las etapas Adulto I y Adulto II poseen, 53% y 66% menos concentración que la etapa Juvenil I. Por estos resultados consideramos que la función de la lectina se regula por el estadio de desarrollo del langostino que se traduce en variaciones en su concentración (Mauchamp & Hubert, 1984).

Después del tratamiento de la lectina con diferentes agentes quelantes, EDTA, EGTA y TT, se determinó actividad hemaglutinante con eritrocitos de rata, el agente EGTA eliminó calcio en mayor proporción, no obstante la actividad hemaglutinante en todos los casos fue similar a la del control. La lectina mejor caracterizada dentro de las lectinas tipo C, es la proteína de unión a manosas, la que por análisis cristalográfico detecta 2 moléculas de calcio en los sitios de unión al carbohidrato, uno de los calcios establece un puente entre la proteína y el azúcar y el otro estabiliza el sitio de unión al carbohidrato, formando enlaces coordinados con aminoácidos cercanos (Feinberg *et al.*, 2000). La unión de la proteína al calcio, ocasiona cambios estructurales en el sitio de unión al carbohidrato, limitando el tamaño de la bolsa disponible para el azúcar orientando así al residuo para colocarlo en forma adecuada (Bouckaert *et al.*, 1996; Velloso *et al.*, 2003). En la lectina de *Cucumaria echinata*, (invertebrado marino), el calcio induce un cambio conformacional moderado en la estructura de la proteína, que le resulta favorable para la unión del azúcar específico, además, aumenta las funciones de la lectina, quien ahora aglutina e incluso hemoliza eritrocitos, además, le confiere protección contra la acción enzimática de tripsina, quimiotripsina y papaína (Sallay *et al.*, 2000).

A las muestras de lectina tratadas con los agentes quelantes, se les determinó estructura secundaria, por dicroísmo circular, en todos los casos la estructura secundaria fue similar con un 24% de  $\alpha$ -hélice y 23% de hebra  $\beta$ . El análisis de los resultados obtenidos nos indica que el calcio presente en la lectina no participa en la estabilidad de la estructura secundaria y su función radica en participar como mediadora en el reconocimiento entre la lectina y el azúcar. El estudio de la participación del calcio en la estructura secundaria de lectinas, es escaso, lo que se conoce está en función del reconocimiento lectina-azúcar. En otras proteínas, sin embargo, se ha reportado la participación del calcio en la estabilización de la estructura secundaria, de las mismas por ejemplo, modifica ostensiblemente la estructura secundaria en Centrina, el contenido de  $\alpha$ -hélice disminuyó de 60% con calcio a 53% en ausencia del mismo y la proporción de laminas  $\beta$  aumento del 12%, con calcio, al 36% sin calcio (Pastrana-Rios *et al.*, 2002); en la Calreticulina, el calcio no afecta significativamente la estructura secundaria pero si modifica el empaquetamiento tridimensional, de la proteína dándole rigidez y estabilidad térmica (Li *et al.*, 2001); finalmente, en otras proteínas la presencia de calcio puede no tener efecto en la estructura secundaria. (Qi *et al.*, 2001).

Las lectinas de los crustáceos decápodos tienen especificidad común por carbohidratos N-acetilados, por lo que asumimos que cuentan con un dominio de reconocimiento conservado. Sin embargo, son pocas las lectinas de este grupo cuya estructura primaria y secundaria se conozca; una de ellas es la lectina del langostino *M. rosenbergii*, con una secuencia de aminoácidos determinada por espectrometría de masas y que muestra un nivel de similitud del 40% con las cadenas ligeras de las moléculas de anticuerpos (Zenteno *et al.*, 2000<sup>b</sup>). La organización estructural tridimensional de estas proteínas se desconoce principalmente por su alta tendencia a la agregación (Vasta, 1992).

## **Participación de la lectina MrL en los mecanismos de defensa del langostino**

Por inmunolocalización con AcM 3G1 anti-MrL soluble se demostró la presencia de una lectina de membrana en 8% de los hemocitos de *M. rosenbergii*,

(Vázquez *et al.*, 1997), esta lectina tiene la misma especificidad que la lectina sérica (MrL). La presencia de lectina en la membrana de hemocitos con homología y especificidad similar a la de la lectina sérica, se ha demostrado también en otros invertebrados, como en el cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Cassels *et al.*, 1986) y en la ostra *Crassostrea virginica* (Vasta *et al.*, 1984). La fagocitosis de células no propias en *M. rosenbergii*, como en otras especies de crustáceos (Hose & Martin, 1989; Vázquez *et al.*, 1998), la llevan a cabo hemocitos granulares (Vázquez *et al.*, 1997; Sierra *et al.*, 1998). La actividad fagocítica es mayor en presencia de eritrocitos de rata, conejo y pollo (con Neu5,9Ac2 en los glicoconjugados de superficie celular) que con eritrocitos de humano o cerdo (con Neu5Ac y Neu5Gc en la superficie celular), (Vázquez *et al.*, 1997; Sierra *et al.*, 1998; Herrler *et al.*, 1987; Sarris & Palada, 1979), lo anterior confirma que la lectina de membrana tiene un papel relevante en la identificación de proteínas, células o glicoconjugados no propios (Ofek & Sharon, 1988; Taylor *et al.*, 1998). La actividad fagocítica se inhibió con mucina submaxilar bovina, que contiene O-glicanos con Neu5,7,8,9Ac4 (Schauer, 1982) y con fetuina, que contiene O-glicanos con Neu5Ac (Rojas *et al.*, 2001), pero no con glicoproteínas sin Neu5Ac en sus oligosacáridos como ovoalbumina (Schauer *et al.*, 1988) o glicoproteínas con N-glicanos sialilados, como la  $\alpha$ 1 glicoproteína ácida, IgM o IgG humana (Egge *et al.*, 1983; Schmid *et al.*, 1979). La importancia de los residuos de ácido siálico en la fagocitosis de estas células, se confirmó al eliminarlo de las glicoproteínas de superficie de los eritrocitos por tratamiento con la enzima sialidasa, que inhibió la capacidad fagocítica de los hemocitos. La especificidad de la lectina de membrana en la fagocitosis, es similar a la de MrL (soluble) que aglutina principalmente eritrocitos de rata, conejo y pollo en concentraciones de 1.5 a 5  $\mu$ g/ml (Vázquez *et al.*, 1994), aunque como se demostró previamente, la lectina soluble no tiene actividad opsonizante (Vázquez *et al.*, 1997).

La activación del estallido respiratorio en hemocitos de *M. rosenbergii* se produjo específicamente con eritrocitos con residuos de Neu5,9Ac2, lo que implica que la especificidad por este azúcar, es fundamental en la activación del estallido respiratorio en el hemocito mediado por la lectina de membrana, sin embargo, tanto MrL como AcM 3G1, activan el estallido respiratorio en la misma proporción.

Si las 2 proteínas se agregan simultáneamente a la monocapa de hemocitos (MrL y AcM 3G1), no muestran efecto, ni sinérgico ni antagónico, en la liberación de radicales libres de oxígeno ( $O^2\cdot$ ), lo que nos permite suponer que la activación del estallido respiratorio a través de la lectina de membrana o a través de receptores para la lectina soluble se produce por caminos metabólicos diferentes. La producción de radicales de  $O^2\cdot$  por hemocitos, se determinó en otros invertebrados, por ejemplo en el equinodermo *Stroglyocentrotus nudus* (Karlsson *et al.*, 2000), en la ostra *Mytilus edulis* (Ito *et al.*, 1992), el caracol *Lymnaea stagnalis* (Pipe, 1992; Adema *et al.*, 1993) la ostra *Crassostrea virginica* (Anderson *et al.*, 1992) y el cangrejo *Carcinus maenas* (Bell & Smith, 1983). En crustáceos decápodos, se ha planteado que el reconocimiento específico de hemocitos a bacterias patógenas, tiene lugar por la activación de procesos oxidativos (Muñoz *et al.*, 2000). Con el propósito de identificar la ruta metabólica que MrL o AcM 3G1 utilizan para activar el estallido respiratorio, se utilizaron algunos inhibidores. La enzima SOD, que cataliza la dismutación de  $O^2\cdot$  a peróxido de hidrógeno (White & Ratcliffe, 1982; Pick *et al.*, 1981), inhibió el efecto inducido tanto por MrL como por AcM 3G1. El efecto de AcM 3G1 en el estallido respiratorio se inhibió por iodoacetamida, y nos permite suponer que la lectina de membrana, que es reconocida por el anticuerpo, activa el metabolismo de la glucosa durante la fagocitosis, aumentando su catabolismo, este efecto es inhibido por la iodoacetamida, cianógeno y otros inhibidores mitocondriales (Bell & Smith, 1983; Pick *et al.*, 1981). En la activación del estallido respiratorio en hemocitos por MrL, el piroxicam inhibe la formación de NBT $\cdot$  en un 75%, por la inhibición del piroxicam en la expresión de ciclooxigenasa inducible (COX2; Femor *et al.*, 2002) mientras que el aumento del ER se da por la activación de las enzimas COX2 y ácido nítrico oxidasa. Estos resultados indican que la lectina sérica activa el estallido respiratorio de los hemocitos del langostino por mecanismos independientes de NADPH, a través de metabolitos pro-inflamatorios, como las prostaglandinas (Femor *et al.*, 2002). Las lectinas, sérica y de membrana, son participantes activos en mecanismos de reconocimiento inmune, tanto humoral como celular; particularmente regulan la generación de radicales oxidativos, que potencialmente podrían funcionar como citotoxinas y/o agentes microbicidas.

## Regulación de la lectina MrL

La cromatografía de filtración en gel de la hemolinfa de *M. rosenbergii*, demostró la presencia de una lectina con actividad hemaglutinante en la fracción de 20 kDa, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta fracción, reaccionaron con proteínas de mayor peso molecular (fracción 1, proteínas de pesos moleculares >a 200 kDa y fracción 2, proteínas de pesos moleculares de 60 - 90 kDa), en estas fracciones no hubo actividad aglutinante. Las fracciones I y III con afinidad por fetuina (o BMS) acoplada a Sepharose-4B, y no por asialofetuina, ovomucoide u orosomucoide acoplados a Sepharose-4B, nos indican que la lectina en ambas fracciones tienen especificidad similar. Las proteínas fetuina y BMS, reconocidas por estas fracciones, tienen en su composición O-glicanos sialilados. La fetuina es una glicoproteína sialilada que en su estructura presenta 3 N-glicanos y 3 O-glicanos, localizados en la porción carboxilo de la proteína (Spiro & Bhojroo, 1974), la mucina submaxilar bovina tiene solamente O-glicanos con Neu9,8,7,5Ac4 en posición terminal (Schauer *et al.*, 1988). Las otras proteínas utilizadas, ovomucoide, glicanos sialilados tipo N y la ovoalbumina, contienen glicanos ricos en manosa (Egge *et al.*, 1983; Schmid *et al.*, 1979), la purificación de las lectinas de MrL en el mismo soporte, indica que la afinidad esta dirigida a O-glicanos sialilados, particularmente ácido siálico.

La pérdida de la actividad hemaglutinante, en los agregados de alto peso molecular de MrL, posiblemente se debe a que el sitio de reconocimiento a carbohidratos se oculte parcial o totalmente por la agregación de la lectina, de tal suerte que los receptores de membrana en el eritrocito no pueden acceder a él, algo similar ocurre con la Langerina, una C-lectina de células de Langerhans que por los cambios producidos durante su oligomerización, modifica la capacidad para unir monosacáridos u oligosacáridos complejos (Stambach & Taylor, 2003). Las lectinas de crustáceos están conformadas por subunidades, la de *Penaeus japonicus*, de 330 kDa por subunidades de 33 kDa (Kondo *et al.*, 1998); o la de *Homarus americanus*, de 19 kDa por subunidades de 5 kDa (Hall & Wang, 1974). Las lectinas MrL-I y MrL-III tienen una composición de aminoácidos similar, con un residuo de cisteína, que permite la formación de puentes disulfuro (Vazquez *et al.*, 1993); el tratamiento de MrL-III con agentes reductores, como DTT o  $\beta$ -

mercaptoetanol, permitió la identificación de unidades monoméricas de 9.6 kDa, los agregados de la lectina no se afectaron con este tratamiento, su estabilización entonces, no se establece a través de puentes disulfuro (Vázquez *et al.*, 1993). La lectina (MrL-III) y el agregado (MrL-I) están formados por 45.9% y 42% de residuos hidrofóbicos, respectivamente. En algunos casos, el fenómeno de agregación en las lectinas induce pérdida de la capacidad hemaglutinante y, como se ha propuesto en lectinas vegetales (Takahashi *et al.*, 1980) y de invertebrados (Subbalakshmi *et al.*, 1999), la causa pudiera ser la formación de zonas extensas de hidrofobicidad en la proteína o más remotamente a errores en el proceso de plegamiento. No obstante, a pesar de la trascendencia del fenómeno ha sido estudiado muy poco en las funciones biológicas (Mor *et al.*, 1994; Feder *et al.*, 2000). En este trabajo demostramos por los resultados de cromatografía de intercambio iónico que MrL-III es una sola proteína, mientras que MrL-I son dos, aunque se desconoce el papel de la segunda proteína, se puede sugerir que participa en la estabilización de los agregados moleculares, como está reportado para lectinas vegetales (Martínez-Cruz *et al.*, 2003). La falta de actividad de MrL-I (y posiblemente de la fracción II), se debe a microheterogeneidad en la parte proteica de la lectina, de acuerdo a reportes para las lectinas de la fruta de *Artocarpus integrifolia* (Sankaranarayanan *et al.*, 1996; Pratap *et al.*, 2002). La jacalina es un caso especial, es específica para galactosa, pero su precursor, por un procesamiento proteolítico postraducciona, cambia su especificidad a manosa (Sankaranarayanan *et al.*, 1996; Pratap *et al.*, 2002); en este contexto las formas inactivas de MrL, podrían representar a los precursores de la lectina funcional MrL-III. La composición de carbohidratos en las lectinas MrL-I y MrL-III, es muy similar, aunque MrL-I contiene mayor cantidad de carbohidratos que MrL-III, pero son disímiles en el perfil de péptidos tripticos, quizá por diferencias en el patrón de glicosilación de las lectinas, pues la presencia de oligosacáridos, cercanos al sitio de digestión en la cadena peptídica pudiera proteger contra el efecto hidrolítico de la tripsina (Hernández *et al.*, 2001; Zenteno *et al.*, 2000<sup>a</sup>). Las diferencias en el contenido de azúcares, no altera la estructura secundaria (Drickamer, 1999), así el espectro obtenido por dicroísmo circular indica un contenido similar de laminas- $\beta$  (23%) y de  $\alpha$ -hélice (24%) en ambas MrL-I y MrL-III.

Como indicamos anteriormente, MrL-I y MrL-III tienen diferentes perfiles de péptidos (masas), analizados por MALDI-TOF, sin embargo tienen 19.4% de péptidos comunes y por el análisis del amino terminal, comparten la misma secuencia. Por degradación de Edman, se identificaron 11 aminoácidos en MrL-I y solo 5 en MrL-III, lo que de manera conjunta con las diferencias en el perfil triptico, refuerza la idea de que las lectinas tienen modificaciones postraduccionales. En un estudio previo, se analizó la secuencia de péptidos de la lectina MrL por MALDI-TOF y se propuso que la lectina presenta homología con proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Zenteno *et al.*, 2000<sup>a</sup>); en este trabajo se muestra que un péptido, común a las proteínas, MrL-I y MrL-III, tiene un 85% de similitud con la región V-D-J de la cadena  $\beta$  del receptor de células T (TCR) de rata (Wildt *et al.*, 1999; Gold *et al.*, 1991) mientras que otros péptidos comunes, presentaron baja homología con la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa de *Rhodomonas salina* (numero de acceso: NP 066474). La homología de los péptidos con el receptor de células T resulta interesante, por lo que una caracterización posterior de las lectinas de *M. rosenbergii* deberá confirmar el papel funcional de las lectinas humorales en los mecanismos de defensa. Los hemocitos granulares de *M. rosenbergii* son capaces de producir una lectina, que puede ser liberada de los depósitos de almacén o ser ensamblada en la membrana de la célula (Vázquez *et al.*, 1997; Sierra *et al.*, 1998); en futuros estudios se confirmarán las modificaciones postraduccionales que la lectina pudiera sufrir y que le permiten su liberación de los gránulos o el ensamble en las membranas de los hemocitos, y cuales requerimientos funcionales podrían ocasionar alguno de estos eventos.



## CONCLUSIONES

- La lectina de *M. rosenbergii* presenta actividad aglutinante con 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.
- Con un anticuerpo monoclonal unido a peroxidasa, se estandarizó un sistema de ELISA para cuantificar la concentración de lectina en hemolinfa que nos permitió determinar la concentración de lectina presente en cuatro estadios de maduración del langostino, con este método, se encontró mayor concentración de lectina en organismos jóvenes que en adultos.
- La lectina podría participar activamente en el transporte de residuos del azúcar N-acetilado en organismos juveniles, pues se requiere mayor concentración de azúcar N-acetilado para inhibir su actividad hemaglutinante, mientras que en organismos adultos participa en mecanismos de defensa.
- El 5% de hemocitos de langostino adulto presentan receptores sialilados para MrL mientras que en el 8% de los hemocitos, la lectina de membrana fue reconocida por anticuerpos dirigidos contra la lectina soluble MrL.
- La mayor actividad fagocítica de los hemocitos de *M. rosenbergii* se dirigió hacia eritrocitos con Neu5,9Ac2 en su membrana, como eritrocitos de pollo, rata y conejo; lo que comprueba que tanto la lectina de membrana como la soluble comparten la especificidad.
- La activación del estallido respiratorio en hemocitos de *M. rosenbergii*, fue mayor con eritrocitos que contenían Neu5,9Ac2, se propone una función en los mecanismos de defensa en la identificación de glicoproteínas o células no propias.
- La activación del estallido respiratorio se presenta en proporciones similares tanto con MrL como con anticuerpos específicos, aunque no de forma sinérgica o antagónica, lo que indica que la activación ocurre por mecanismos metabólicos diferente.

- Los anticuerpos activan el estallido respiratorio a través del metabolismo de la glucosa, pues el ER se inhibe por iodoacetamida; el efecto de MrL, depende de la activación de la enzima ciclooxigenasa por mecanismos independientes de NADPH, pues el piroxicam inhibe su función.
- Se propone que MrL, presente en forma soluble y de membrana, participa en mecanismos de reconocimiento inmune, tanto humoral, (soluble), como celular, (de membrana), posiblemente regulando la generación de radicales de oxígeno que funcionarán como agentes citotóxicos o microbicidas.
- La identificación de proteínas inactivas, por anticuerpos anti -MrL, podría indicar la existencia de precursores de MrL.
- El fenómeno de agregación de la lectina se podría proponer como un mecanismo de regulación en el langostino, por su actividad contra proteínas con cadenas largas de oligosacáridos sialilados, (mucina sérica bovina o fetuína) y no contra oligosacáridos sialilados de cadena corta, presentes en la membrana de eritrocitos.
- Se identificó una proteína en los agregados con posible función estabilizadora de los mismos.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Adema, C.M., E.C. van Deutekom-Mulder, W.P. van der Knaap, T. Sminia (1993), "NADPH-oxidase activity: the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*". **J. Leukoc. Biol.** 54:379-383.
- Agundis, C., A. Pereyra, R. Zenteno, C. Brassart, C. Sierra, L. Vázquez, E. Zenteno (2000), "Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA". **Comp. Biochem. Physiol. B.** 127:165-172.
- 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.
- Anderson, R.S., L.M. Oliver, L.L. Brubacher (1992), "Superoxide anion generation by *Crassostrea virginica* hemocytes as measured by nitroblue tetrazolium reduction". **J. Inv. Path.** 59:303-307.
- Arason, G.D. (1996), "Lectins as defense molecules in vertebrates and invertebrates". **Fish Shellfish Immunol.** 6:277-289.
- Ashwell, G., J. Harford (1982), "Carbohydrate-specific receptors of the liver". **Annu. Rev. Biochem.** 51:531-554.
- Avrameas, S., T. Ternyck (1971), "Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration". **Immunochemistry** 8:1175-1179.
- 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. (1988), "Crustáceos: Tecnología de cultivo". Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Bayne, C.J. (1990), "Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates". **BioScience** 40:723-731.

- Bell, K.L., V.J. Smith (1983), "In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas* L". **Dev. Comp. Immunol.** 17:211–219.
- Bidlingmeyer, B.A., S.A. Cohen, T.L. Tarvin (1984), "Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization". **J. Chromatogr.** 336:93-104.
- 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.
- Bouckaert, J., F. Poortmans, L. Wyns, R. Loris (1996), "Sequential structural changes upon zinc and calcium binding to metal-free concanavalin A". **J. Biol. Chem.** 271:16144–16150.
- Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-dye binding". **Anal. Biochem.** 72:248-254.
- Brock, J.A. (1993), "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. Edited by McVey, J.P. Maryland, USA.
- Cassels, F.J., J.J. Marchalonis, G.R. Vasta (1986), "Heterogeneous humoral and hemocyte-associated lectins with N-acetylamino sugar specificities from the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun". **Comp. Biochem. Physiol. B.** 85:23-30.
- 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.** 125:333-343.
- 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.** 33:290-297.
- Cheng, W., J.C. Chen (1998<sup>a</sup>), "Enterococcus-like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity". **Dis. Aquat. Organ.** 34:103-108.

- Cheng, W., J.C. Chen (1998<sup>b</sup>), "Isolation and characterization of an Enterococcus-like bacterium causing muscle necrosis and mortality in *Macrobrachium rosenbergii* in Taiwan". *Dis. Aquat. Organ.* 34:93-101.
- Cheng, W., J.C. Chen (2000<sup>a</sup>), "Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*". *Fish Shellfish Immunol.* 10:387-391.
- Cheng, W., J.C. Chen (2000<sup>b</sup>), "Enterococcus like infections in *Macrobrachium rosenbergii* are exacerbated by high pH and temperature but reduced by low salinity". *Dis. Aquat. Org.* 34:103-108.
- Cohen, E. (1968), "Immunologic observations of the agglutinins on the hemolymph of *Limulus polyphemus* and *Birgus latro*". *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 30:427-432.
- Dandapat, J., G.B. Chainy, K.J Rao (2000), "Dietary vitamin-E modulates antioxidant defense system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*". *Comp. Biochem. Physiol. C* 127:101-115.
- Davies, D.H., T.K. Hayes, S.B. Vinson (1988), "Preliminary characterization and purification of in vitro encapsulation promoting factor: a peptide that mediates insect haemocyte adhesion". *Dev. Comp. Immunol.* 12:241-253
- Dazzo, F., J. Sherwodd (1983), "Trifoliin A: a Rhizobium recognition lectin in white clover roots". In Chemical Taxonomic, Molecular Biology and Function of Plant Lectins. Goldstein I.J. y M.E. Etzler ed. pp. 209-223.
- Destoumieux, D., C. Muñoz, J. Cosseau, P. Rodríguez, P. Bulet, E. Bachere (2000), "Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge". *J. Cell Sciences* 113:461-469.
- Destoumieux-Garzón, D., D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet, E. Bachere (2001), "Crustacean immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge". *J. Biol. Chem.* 276:47070-47077.
- Drickamer, K. (1988), "Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectin". *J. Biol. Chem.* 263:9557-9560.
- Drickamer, K. (1999), "C-type lectin-like domains", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:585-590.

- Drickamer, K., M.E. Taylor (1993), "Biology of animal lectins". *Annu. Rev. Cell. Biol.* 9:237-264.
- Du Pasquier, L. (1989), "Evolution of the immune system". In: *Fundamental Immunology*: Edited by William E. Paul. 2<sup>nd</sup> Ed, Raven Press Ltd. N.Y. Pp. 139-165.
- Durliat, M. (1985), "Clotting processes in crustacea decapoda". *Biol. Rev.* 60:473-498.
- EGge, H., J. Peter-Katalinic, J. Paz-Parente, G. Strecker, J. Montreuil, B. Fournet (1983), "Carbohydrate structures of hen ovomucoid. A mass spectrometric analysis". *FEBS Lett.* 156:357-362.
- Engvall, E., P. Perlmann (1971), "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G". *Immunochemistry* 8:871-873.
- Feder, R., A. Dagan, A. Mor (2000), "Structure-activity relationship study of antimicrobial dermaseptin S4 showing the consequences of peptide oligomerization on selective cytotoxicity". *J. Biol. Chem.* 275:4230-4238.
- Feinberg, H., S. Park-Snyder, A.R. Kolatkar, C.T. Heise, M.E. Taylor, W.I. Weis (2000), "Structure of a C-type carbohydrate recognition domain from the macrophage mannose receptor". *J. Biol. Chem.* 275:21539-21548.
- Fermor, B., J.B. Weinberg, D.S. Pisetsky, M.A. Misukonis, C. Fink, F. Guilak (2002), "Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway". *Osteoarthritis Cartilage* 10:792-798.
- Findlay, J.B.C., D. Pappin, J. Keen (1989), "Automated solid-phase micro sequencing". In Findlay (Ed), *Protein sequencing*, JBC IRL Press-Oxford University Press UK.
- Fragkiadakis, G.A., E.K. Stratakis (1997), "The lectin from the Crustacean *Liocarcinus depurator* recognizes O-acetylsialic acids". *Biochem. Mol. Biol.* 117:545-552.
- Freire-Márquez, M.R., M.A. Barracco (2000), "Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans". *Aquaculture* 191:23-44.
- Gold, D.P., H. Offner, D. Sun, S. Wiley, A.A. Vandenberg, D.B. Wilson (1991), "Analysis of T cell receptor beta chains in Lewis rats with experimental allergic

- encephalomyelitis: conserved complementarity determining region 3". *J. Exp. Med.* 174:1467-1476.
- 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.
- Hall, J.L., D.T. Rowlands (1974), "Heterogeneity of lobster agglutinins: II Specificity of agglutinin-erythrocyte binding". *Biochemistry* 13:828-832.
- Hall, J.L., R. Wang (1974), "Heterogeneity of lobster agglutinins: I. purification and physicochemical characterization". *Biochemistry* 13:821-827.
- Harlow, E., D. Lane (1998), "Antibodies. A laboratory manual". Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Hellman, U., C. Wernstedt, J. Gopez, C. Heldin (1995), "Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing". *Anal. Biochem.* 224:451-455.
- Hernández, P., H. Debray, H. Jaekel, Y. Garfias, M.C. Jiménez, S. Martínez-Cairo, E. Zenteno (2001), "Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *hypocondriacus* by 2-D proteome analysis". *Glycoconjugate J.* 18:321-329.
- 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.
- Herrler, G., G. Reuter, R. Rott, H.D. Klenk, R. Schauer (1987), "N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid, the receptor determinant for influenza C virus, is a differentiation marker on chicken erythrocytes". *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 368:451-454.
- Hildemann, W.H. (1974), "Phylogeny of immune responsiveness invertebrates". *Life Sciences* 14:605-614.
- Hose, J.E., G.G. Martin (1989), "Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*". *J. Invertebr. Pathol.* 53:335-346.
- Ito, T., T. Matsutani, K. Mori, T. Nombra (1992), "Phagocytosis and hydrogen peroxide production by phagocytes of the sea urchin *Strongylocentrotus nudus*". *Dev. Comp. Immunol.* 16:287-294.

- Iwanaga, S. (2002), "The molecular bases of innate immunity in the horseshoe crab". *Curr. Opin. Immunol.* 14:87-95.
- Iwanaga, S., S.I. Kawabata (1999), "Rol of the lectins in the innate immunity of horseshoe crab". *Dev. Comp. Immunol.* 23:391-400.
- Johansson, M.W., K. Söderhäll (1989), "Cellular immunity in crustaceans and the proPO system". *Parasitology Today* 5:171-176.
- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll (2000), "Crustacean haemocytes and haematopoiesis". *Aquaculture* 191:45-52.
- Johnson, H.M. (1964), "Human blood group A-specific agglutinins of the butter clam *Saxidomus giganteus*". *Science* 146:548-550.
- Karlsson, A., J.B. Nixon, L.C. McPhail (2000), "Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase". *J. Leukoc. Biol.* 67:396-404.
- 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 Sarchophaga peregrina lectin in the lysis of sheep red blood cells injected into the abdominal cavity of larvae". *Dev. Comp. Immunol.* 9:31-36.
- Kondo, M., T. Itami, Y. Takahashi (1998), "Preliminary characterization of lectins in the hemolymph of kuruma prawn". *Fish Pathol.* 33:429-435.
- Kopacek, P., L. Grubhoffer, K. Söderhäll (1993), "Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysacarides from plasma of the craysfish *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.
- Kotani, E., M. Yamakawa, S. Iwamoto, M. Tashiro, H. Mori, M. Sumida, F. Matsubara, K. Taniai, K. Kadono-Okuda, Y. Kato et al. (1995), "Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor". *Biochim. Biophys. Acta* 1260:245-58.



- 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.** 58:469-474.
- Le Moullac, G., P. Haffner (2000), "Environmental factors affecting immune responses in Crustacea". **Aquaculture** 191:121-131.
- Lee, S.Y., K. Söderhäll, (2002), "Early events in crustacean innate immunity". **Fish Shellfish Immunol.** 12:421-437.
- Li, Z., W.F. Stafford, M. Bouvier (2001), "The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability". **Biochemistry** 40:11193-11201.
- 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.** 65:383-390.
- Maldonado, G., F. Porras, L. Fernández, L. Vázquez, E. Zenteno (1994), "Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity". **Immunol. Inv.** 23:429-436.
- Marchalonis, J.J., G.M. Edelman (1968), "Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*". **J. Mol. Biol.** 32:467-470.
- Martinez-Cruz, M., E. Perez-Campos, E. Zenteno, F. Cordoba (2003), "Analysis of the lectins from teosinte (*Zea diploperensis*) and maize (*Zea mays*) coleoptiles". **J. Agric. Food. Chem.** 51:3783-3789.
- Mauchamp, B. (1982), "Purification of an 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 *pietis 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.** 62:3045-3050.
- McCumber, L.J., E.M. Hoffman, L.W. Clem (1979), "Recognition of viruses and xenogenic proteins by the blue crab, *Callinectes sapidus*. I. Clearance and organ distribution". **J. Invert. Pathol.** 33:1-9.
- McEver, R.P., K.L. Moore, R.D. Cummings (1995), "Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions". **J. Biol. Chem.** 270:11025-11028.
- Miller, R.L. (1987), "Properties of a sialic acid-specific lectin from the slug *Limax flavus*". **Methods Enzymol.** 138:527-536.
- Mirelman, D., E. Galun, N. Sharon, R. Lotan (1975), "Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin". **Nature** 256:414-416.
- 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.** 203:253-261.
- Mor, A., K. Hani, P. Nicolas (1994), "The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms". **J. Biol. Chem.** 269:31635-31641.
- Muñoz, M., R. Cedeño, J. Rodríguez, W.P.W. van der Knaap, E. Mialhe, E. Bachere (2000), "Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*". **Aquaculture** 191:89-107.
- Muta, T., 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.

- Ofek, I., N. Sharon (1988), "Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria". *Infect. Immun.* 56:539-547.
- Pastrana-Rios, B., W. Ocaña, M. Rios, G.L. Vargas, G. Ysa, G. Poynter, J. Tapia, J.L. Salisbury (2002), "Centrin: its secondary structure in the presence and absence of cations". *Biochemistry* 41:6911-6919.
- Peebles, J.B. (1977), "A Rapid technique for molt staging 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., K. Söderhäll (1987), "Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*". *Cell. Tissue Res.* 247:409-303.
- Pick, E., J. Charon, D. Mizel (1981), "A rapid densitometric microassay for nitroblue tetrazolium reduction and application of the microassay to macrophages". *J. Reticuloendothel. Soc.* 30:581-593.
- Pipe, R.K. (1992), "Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*". *Dev. Comp. Immunol.* 16:111-122.
- Pratap, J.P., A.A. Jeyaprakash, P.G. Rani, K. Sekar, A. Surolia, M. Vijayan (2002), "Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl-alpha-D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity". *J. Mol. Biol.* 317:237-247.
- Pusztai, A. (1991), "Plant lectins". Cambridge University Press. Cambridge U.K.
- Qi, X.F., S. Bagby, Z. Gombos, M. Ikura, A. Chakrabarty (2001), "Alternate routes to conformational specificity in a Greek key b barrel protein". *Eur. J. Biochem.* 268:4653-4663.
- Ratcliffe, N.A. (1989), "The biological significance of immunity". *Dev. Comp. Immunol.* 13:273-283.
- 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.* 260:8850-8856.

- Roitt, I., J. Brostoff, D. Male (1998), "Immunology". Mosby Ed, Londres, U.K.
- Rojas, E., P. Llinas, A. Rodriguez-Romero, C. Hernandez, E. Zenteno, R. Lascurain (2001), Hevein, an allergenic lectin from rubber latex, activates neutrophils' oxidative burst. *Glycocon. J.* 18:339-345.
- Rook, G.A.W., J. Steele, S. Umar, H.M. Dockrell (1985), "A simple method for the solubilization of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by  $\gamma$ -interferon". *J. Immunol. Methods* 82:161-167.
- 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.* 6:209-218.
- Sahul-Hameed, A.S., M. Xavier Charles, M. Anilkumar (2000), "Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus". *Aquaculture* 183:207-213.
- Sallay, I., S. Tojo, K. Nomiya, Y. Kouzuma, M. Kimura, N. Yamasaki (2000), "Calcium ions stabilize a protein of hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata*". *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 65:1347-1352.
- Sankaranarayanan, R., K. Sekar, R. Banerjee, V. Sharma, A. Surolia, M. Vijayan (1996), "A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold". *Nat. Struct. Biol.* 3:596-603.
- Sarris, A.H., G.E. Palade (1979), "The sialoglycoproteins of murine erythrocyte ghosts. A modified periodic acid-Schiff stain procedure staining nonsubstituted and O-acetylated sialyl residues on glycopeptides". *J. Biol. Chem.* 254:6724-6731.
- Savage, D., G. Mattson, S. Desai, G. Nielander, S. Morgensen, E. Conklin (1992), "Avidin-Biotin Chemistry: A handbook". Rockford IL: Pierce Chemical Co. USA.
- Schauer, R. (1982), "Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids". *Adv. Carb. Chem. Biochem.* 40:131-235.

- Schauer, R., J. Casals-Stenzel, A.P. Corfield, R.W. Veh (1988), "Subcellular site of the biosynthesis of O-acetylated sialic acids in bovine submandibular gland". ***Glycocon. J.*** 5:257-270.
- Schmid, K., J.P. Binette, L. Dorland, J.F. Vliegenthart, B. Fournet, J. Montreuil (1979), "The primary structure of the asialo-carbohydrate units of the first glycosylation site of human plasma alpha1-acid glycoprotein". ***Biochim. Biophys. Acta*** 581:356-359.
- Sharon, N., H. Lis (1987), "A century of lectin research (1888-1988)". ***Trends 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. Perez, C. Agundis, E. Zenteno, L. Vazquez (1998), "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, pp. 961-970
- Smith, V.J., K. Söderhäll (1983), "Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro". ***Cell. Tissue. Res.*** 233:295-303.
- Söderhäll, K., V.J. Smith (1983), "Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution". ***Dev. Comp. Immunol.*** 7:229-239.
- Söderhäll, K., V.J. Smith (1986), "The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and roles in arthropod cellular immunity with special reference to crustaceans". In: Bréhélin M. (ed) *Immunity in invertebrates*, Springer, Berlin.
- 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.

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

- Spiro, R.G., V.D. Bhojroo (1974), "Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin". **J. Biol. Chem.** 249:704-711.
- Stambach, N.S., M.E. Taylor (2003), "Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells". **Glycobiology** 13:401-410.
- Subbalakshmi, C., R. Nagaraj, N. Sitatam (1999), "Biological activities of C-terminal 15-residue synthetic fragment of melittin: design of an analog with improved antibacterial activity". **FEBS letters** 448:62-66.
- 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.** 76:278-284.
- Takahashi, T., M. Itoh, Y. Shimabayashi (1980), "Aggregation and fragmentation of *Phaseolus vulgaris* lectin". **Agric. Biol. Chem.** 44 1655-1657.
- Takamatsu, N., M. Heishi, K. Muramoto, H. Kamiya, T. Shiba (1994), "Cloning and analysis of the gene encoding lectin from the acorn barnacle *Megabalanus rosa*". **Gene** 150:407-408.
- Taylor L., E. Duarte, M. Reyes, N. Elizondo, G. Maldonado, E. Zenteno (1998), "Interaction of murine macrophage-membrane proteins with components of the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*". **Clin. Exp. Immunol.** 113:423-428.
- Thornqvist, P. O., M. W. Johansson, K. Söderhäll (1994), "Opsonic activity of cell adhesion proteins and b-1,3-glucan binding proteins from two crustacean". **Dev. Comp. Immunol.** 18:3-12.
- 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.
- Tyson, C.J., C.R. Jenkin (1974), "Phagocytosis of bacteria in vitro by haemocytes from the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*)". **AJEBAK** 52:341-348.
- Uhlenbruck, G., O. Prokop (1966), "An agglutinin from *Helix pomatia*, which reacts with terminal N-acetyl-D-galactosamine". **Vox Sang.** 11:519-520.

- 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 Harrevald, A. (1936), "A physiological solution for freshwater crustaceans". **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 34:428-432.
- Varki, A. "Discovery and classification of animal lectins", in A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth (Eds.), *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999, pp. 333-343.
- Varki, A., R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth (1999), "Essentials of glycobiology". Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Vasta, G.R. (1992), "Invertebrate Lectins: Distribution, synthesis, molecular biology and function". In *Glycoconjugates*. Eds. Allen H.J. and M. Deckker, New York.
- 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.** 88:475-485.
- 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*". **Comp. Biochem. Physiol. B.** 105:617-623.
- 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. Montaña, E. Zenteno (1994), "Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii* hemolymph". In: Lectins: Biol. Biochem Clin Chem. E. Van Driessche, T.C. Bog Hansen Eds. Vol 10. Textop Hellerup, Denmark. pp. 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. B.** 113:355-359.
- Velloso, L.M.K. Svensson, R.F. Pettersson. Y. Lindqvist (2003), "The crystal structure of the carbohydrate-recognition domain of the glycoprotein sorting receptor p58/ ERGIC-53 reveals an unpredicted metal-binding site and conformational changes associated with calcium ion binding". **J. Mol. Biol.** 334:845-851.
- 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.** 10:559-563.
- Viele, M., E. Donegan, E. Bossom (1997), "Banco de sangre e inmunohematología". In D.P. Stites, A.I. Terr, T.G. Parslow (Eds.), Inmunología básica y clínica. Manual moderno, D.F. Mexico. pp 319-332.
- White, K.N., N.A. Ratcliffe (1982), "The segregation and elimination of radio and fluorescent-labelled marine bacteria from the haemolymph of the shore crab, *Carcinus maenas*". **J. Mar. Biol. Assoc. UK.** 62:819-833.
- 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.
- Wildt, R.M., R.M.A. Hoet, W.J. van Venrooij, I.M. Tomlinson, G. Winter (1999), "Analysis of heavy and light chain pairings indicates that receptor editing shapes the human antibody repertoire". **J. Mol. Biol.** 285:895-901.
- 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., C. Sierra, A. Pereyra, S. Bouquelet, E. Zenteno (2000<sup>a</sup>), "Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) by MALDI-TOF". ***Comp. Biochem. Physiol. B*** 127:243-250.

Zenteno, R., L. Vázquez, S. Martínez-Cairo, S. Bouquelet, C. Agundis, E. Zenteno (2000<sup>b</sup>), "Identification of lectin isoforms in juvenile freshwater prawns *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan, 1879)". ***Glycocon J.*** 17:339-347.