



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**PROTEINAS RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE
INTERLEUCINA 2 EN HEMOCITOS DE LANGOSTA *Cherax*
*quadricarinatus***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

OSCAR VIVANCO ROJAS



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

VOCAL: Profesor: ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIO: Profesor: MARIA CONCEPCION AGUNDIS MATA

1er. SUPLENTE: Profesor: JOSE PEDRAZA CHAVERRI

2° SUPLENTE: Profesor: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 6, DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

MARIA CONCEPCION AGUNDIS MATA

SUPERVISOR TÉCNICO:

MOHAMED ALI PEREYRA MORALES

SUSTENTANTE:

OSCAR VIVANCO ROJAS

El presente trabajo se realizo bajo la dirección de la Dra Ma. Concepción Agundis Mata, el Dr. Mohamed Ali Pereyra Morales y el Dr. Juan José Alpuche Osorno, en el laboratorio 6, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

Esta tesis fue parcialmente financiada por el proyecto PAPIIT IN226211.
“Caracterización Bioquímica de la lectina de *Cherax quadricarinatus* y su receptor celular”

Y el proyecto ECOS (M09S02) ANUIES-México-Francia

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
I INTRODUCCION	
1. Sistema Inmune	4
2. Inmunidad en invertebrados	5
2.1 Fagocitosis	7
2.2 Encapsulación	8
2.3 Proteínas de la coagulación y péptidos antimicrobianos	9
2.4 Lectinas	11
2.5 Sistema proPO	12
3. Receptores celulares PRR	
3.1 BGBPs, PBBPs, PNGs	14
3.2 Receptores tipo Toll	16
4. Interleucina 2 (IL-2) y su receptor (IL-2R)	17
5. IL-2R en invertebrados	21
II HIPOTESIS	23
III OBJETIVO	23
IV MATERIALES	
1. Líneas celulares	24
2. Organismos	24
3. Propagación del cultivo	25
4. Producción del liquido de ascitis	25
5. Purificación del anticuerpo monoclonal (Anti-CD25)	26
6. Acoplamiento a FITC al anticuerpo monoclonal	27
7. Acoplamiento a peroxidasa al anticuerpo Anti-CD25	27
8. Obtención de hemolinfa y células	28
9. Viabilidad celular	28
10. Ensayos de adhesión celular	29
11. Inmunocitoquímica	30
12. Electroforesis SDS-PAGE	31
13. Inmunoelectrotransferencia	32
V RESULTADOS	34
VI DISCUSION	41
VII CONCLUSIONES	50
VIII PERSPECTIVAS	51
IX BIBLIOGRAFIA	52

Abreviaturas

BSA	Albumina Sérica Bovina
BGBPS	Proteínas de unión a β -Glucanos
CD25 o IL-2R α	Subunidad alfa del receptor de interleucina 2
DOPA	Dihidroxifenilalanina
FDA	Food and Drugs Administration
FITC	Isocianato de fluoresceína
IL-2	Interleucina 2
LGBPs	Proteínas de unión a lipolisacarido
LPS	Lipopolisacarido
NO	Oxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PGBPs	Proteínas de unión a peptidoglicanos
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PO	Fenol Oxidasa
proPO	Profenol Oxidasa
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino

Resumen:

En la respuesta inmune en crustáceos se han identificado factores séricos con alta especificidad para antígenos de patógenos, sin embargo existen células que también participan en el reconocimiento y eliminación de patógenos, a través de receptores de membrana o de los contenidos de los gránulos. Estos receptores de membrana podrían ser precursores en otras especies de proteínas de mayor complejidad en donde podrían desempeñar funciones similares. En estudios previos se reportó en el invertebrado *Mytilus galloprovincialis*, la presencia de proteínas, semejantes a la subunidad alfa del receptor de interleucina 2 (IL-2R α). La IL2 es una citocina de la inmunidad adaptativa de vertebrados que participa en la proliferación de las células T al unirse a su receptor (IL2-R). El identificar la presencia de proteínas propias de vertebrados en invertebrados, nos permite suponer que existen moléculas con semejanza estructural que pudieran estar relacionadas con los distintos mecanismos de defensa de los invertebrados. Una herramienta que ayuda a la identificación de proteínas, son los anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente epítomos con una secuencia única, y con una gran afinidad, que nos permiten inferir la presencia en hemocitos de proteínas con epítomos compartidos con IL-2R α . Con fundamento en lo antes expuesto, identificamos por SDS-PAGE e IET la presencia de proteínas relacionadas con el receptor de interleucina 2 en hemocitos de la langosta *Cherax quadricarinatus*. Partiendo de lisados celulares de hemocitos, obtenidos con solución anticoagulante para crustáceos, se realizó una electroforesis, posteriormente, un Western Blot, que se reveló con un anticuerpo monoclonal contra la subunidad alfa del receptor de IL-2 (CD25) acoplado a peroxidasa, que evidenció una proteína con peso molecular de 36 KDa. Se efectuó una inmunocitoquímica con hemocitos fijados con paraformaldehído, con este propósito se marcaron las células con anticuerpos anti-IL-2R (anti-CD25) acoplado a fluoresceína, las laminillas se observaron en un microscopio de epifluorescencia, mostrando marcaje positivo en los gránulos de células grandes lo que sugiere la presencia de proteínas en gránulos de hemocitos, similares a IL-2R α presente en vertebrados y considerando que los hemocitos granulares de invertebrados en general participan en la regulación de la respuesta contra patógenos por acción de

la desgranulación, es posible que las proteínas encontradas participen en los distintos mecanismos de defensa o bien en la regulación de la respuesta de los mecanismos efectores.

I. INTRODUCCION:

1. Sistema inmune

En organismos vertebrados sistema inmune se encuentra constituido por órganos y por células; es responsable de los mecanismos de defensa específicos contra patógenos y agentes extraños capaces de ocasionar infecciones tanto intracelulares como extracelulares. La capacidad de un organismo para mantenerse libre de infecciones depende tanto de su resistencia natural o innata como de la resistencia que pueda desarrollar o adquirir durante su vida. La inmunidad innata y la adaptativa dependen del primer contacto con el agente infectante, con la diferencia que la inmunidad adquirida tiene memoria inmunológica respondiendo de manera específica y eficiente en un segundo reto, mientras que la innata responde de la misma manera con exposiciones subsecuentes (Rojas, 2006). Estos dos tipos de inmunidad se caracterizan por los diferentes componentes del sistema inmune que hacen posible la eliminación de los diferentes agentes infectantes, la inmunidad adaptativa humoral está mediada por anticuerpos en la sangre así como en las secreciones, que son producidos por linfocitos B; los anticuerpos reconocen antígenos microbianos, neutralizan la infección por estos microbios y tienen como objetivo la eliminación de los patógenos por diferentes mecanismos efectores. Este tipo de inmunidad es el principal mecanismo de defensa contra patógenos extracelulares y sus toxinas, ya que los anticuerpos producidos pueden unir a estos microorganismos y toxinas para ayudar en su eliminación (Abbas, 2012); mientras que la inmunidad celular involucra a células especializadas en el reconocimiento y eliminación de los

patógenos. El estudio de la inmunología comparada (Du Pasquier, 2001) demuestra una mayor complejidad en el sistema inmune de los vertebrados, en particular en los mamíferos, aunque la aparición del sistema inmune adaptativo en los vertebrados no hay sido definido concretamente (Pancer y Cooper, 2006).

2 Inmunidad en invertebrados

El estudio de invertebrados es una importante fuente de datos sobre los orígenes del sistema inmunitario no adaptativo de los vertebrados. Los invertebrados abarcan el 95% del conjunto total de especies animales, por lo que aportan un gran número de posibles modelos experimentales; la investigación sobre la inmunidad en invertebrados se ha centrado en artrópodos y moluscos, ya que muchos de ellos constituyen plagas trasmisoras de enfermedades o destructoras de productos agrícolas (Roitt, 2003). El análisis de especies tanto de vertebrados como de invertebrados, sugiere que los mecanismos de defensa de los invertebrados se pueden considerar precursores de la inmunidad de los vertebrados, estos eventos requieren de la participación de grupos celulares y factores humorales generados contra antígenos específicos como los demostrados en vertebrados (Iwanaga et al., 2005; Hoffman et al., 1999).

Los crustáceos poseen un sistema circulatorio abierto mediante el cual se distribuyen nutrientes, oxígeno, hormonas, moléculas inmunoreactivas, células fagocíticas y enzimas que juegan un papel importante en la respuesta inmune de la especie.

El estudio de la inmunidad de invertebrados se ha enfocado en la identificación de los mecanismos y rutas bioquímicas activadas durante una infección, además, de identificar a las células y los factores humorales en la hemolinfa, involucrados en la destrucción de patógenos, en la regulación y en la reparación del daño. La inmunidad en crustáceos ha sido principalmente estudiada en suero, donde se han identificado factores con gran capacidad de reconocimiento, con alta especificidad, similar a la de los anticuerpos en el reconocimiento de antígenos (Bachère 2000, Vázquez et al., 1997). Los crustáceos carecen de un sistema inmune adaptativo, pero tienen desarrollado un sistema de defensa que responde contra antígenos de la superficie de patógenos. Estos mecanismos de defensa dependen completamente del sistema inmune innato. La activación del sistema inmune innato es realizada por los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) que son reconocidos por proteínas de superficie o solubles, provocando la activación celular y/o humoral; y los mecanismos efectores que destruyen a los patógenos (Vázquez et al., 2009).

Las barreras físicas son el primer obstáculo que detiene a los patógenos (Söderhäll, 1982). Cuando son dañadas estas barreras, los microorganismos invaden el tejido, se activan rutas proteolíticas, permitiendo la disminución y la eliminación de microbios que invaden al organismo (Ratcliffe et al., 1985). Si los microorganismos pasan esta primera barrera, hay mecanismos que los limitan y permiten la activación de otras rutas, tales como la cascada de la coagulación, que además, evita la pérdida de la hemolinfa, estimula la producción de metabolitos oxidantes y melanina, activando con ello el sistema de la profenoloxidasas (proPO) (Kawabata et al, 1990; Vargas-Albores et al., 2000). Este proceso permite la

activación de los demás mecanismos de defensa que incluyen la fagocitosis, la encapsulación, la formación de nódulos, la coagulación, la aglutinación y la actividad microbicida (Sritunyalucksana et al., 2000).

La inmunidad celular en crustáceos esta poco estudiada, se ha identificado que los hemocitos o células sanguíneas se dividen en tres grupos los cuales han sido clasificados solo de acuerdo a su morfología y contenido granular (Söderhäll, 2010),. Morfológicamente se consideran análogos a los leucocitos de los vertebrados ya que poseen en su interior gránulos con diferente contenido: proteínas de reconocimiento, de ataque, moléculas de adhesión y enzimas reguladoras. Las células hialinas son las más simples, no presentan gránulos intracitoplasmáticos, una vez activadas liberan factores que participan en la formación de coagulo y en procesos como la fagocitosis. Los semigranulocitos presentan gránulos intracitoplasmáticos que al activarse liberan factores bactericidas con función opsonizante. Las células granulocíticas, consideradas las más complejas del sistema de defensa, presentan múltiples gránulos intracitoplasmáticos que tras la activación celular, liberan una gran cantidad de factores reguladores y de ataque. El principal mecanismo de defensa de los crustáceos liberado por estas células, es el sistema de la proPO, así como péptidos anti-fúngicos y anti-microbianos.

2.1 Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso llevado a cabo por los hemocitos, permite reconocer y eliminar moléculas no propias, presentes en bacterias, esporas o bien células

senescentes del propio organismo, contribuyendo a mantener la homeostasis. La fagocitosis es un proceso inmune que se ha conservado entre los distintos seres vivos (Mudlarz et al., 2006), y algunos de sus mecanismos de reconocimiento también. El reconocimiento opsonico de los patógenos, varía dependiendo de la especie de crustáceo. El cangrejo de agua dulce *Parachaeraps bicarinatus* y *Cherax destructor* reconocen particularmente a bacterias Gram negativas como *Pseudomonas spp* y *Escherichia coli* (Mckay y Jenkin, 1970). los hemocitos de la langosta *Homarus americanus* reconoce solamente a bacterias Gram negativas pero no Gram positivas (Mori y Stewart, 2006).

2.2 Encapsulación

La encapsulación es un mecanismo celular para eliminar partículas extrañas las cuales no pueden ser destruidas por mecanismos humorales. Este proceso mata a los patógenos, o al menos restringe su movimiento y crecimiento en el hemocele. Se ha identificado *in vitro* que en los agregados celulares de hemocitos semigranulares de *Astacus leptodactylus*, presentan factores de adhesión que rodean a las células extrañas, o en presencia de partículas mayores de 10µm de diámetro, como algunas esporas de hongos y los helmintos (Durliat, 1985). Se ha considerado que una capsula típica consta de aproximadamente 30 capas de hemocitos, sin espacios intracelulares. El aspecto morfológico de la cápsula puede presentar una ligera variación debido a la extensión y cantidad de células, si hay necrosis la presencia o ausencia de melanina, así como la cantidad de material extraño. De acuerdo con los diferentes crustáceos, se ha demostrado por

histoquímica que en el proceso participan mucopolisacáridos y glicoproteínas ácidas o neutras (Rater y Vinson, 1983). La destrucción de los microorganismos ocurre por disminución de la concentración de oxígeno y la acción de hidrolasas o bien por la acción tóxica de las quinonas, moléculas se ha propuesto que están presentes en el contenido granular y que su expresión aumenta durante una infección (Söderhäll et al., 1998, Mitta et al., 2000a).

2.3 Proteínas de la coagulación y péptidos antimicrobianos

Las proteínas de coagulación desempeñan varias funciones: son esenciales para prevenir la pérdida de la hemolinfa en caso de lesiones; en algunos crustáceos estas proteínas participan en el reconocimiento y la neutralización de moléculas o partículas no propias (Iwanaga y Lee, 2005). En algunos crustáceos la coagulación está basada en la acción de transglutaminasas por la unión cruzada con las proteínas de la coagulación en presencia de Ca^{2+} . Las proteínas de la coagulación presentan funciones similares, pero no comparten similitud estructural entre crustáceos, aunque se han encontrado en un homólogo de la transglutaminasa de *T. tridentus* en bibliotecas de cDNA de hemocitos de *L. vannamei* (Kawabata et al., 1996); Las proteínas de la coagulación se encuentran solubles en la hemolinfa y las transglutaminasas son liberadas desde hemocitos cuando bacterias Gram negativas invaden al crustáceo y LPS bacteriano es reconocido por los receptores específicos de membrana para LPS (Ariki et al, 2004)

En *Tachypleus tridentatus* el sistema de coagulación, en presencia de LPS o β -1,3-glucanos en bacterias u hongos respectivamente, activa zimógenos de serina-proteasas que siguen la cascada. Se han identificado proteínas con actividad microbicida en los gránulos de varios hemocitos circulantes de crustáceo (Destoumieux et al., 2004), por ejemplo una proteína de 11.5 kDa de *Carcinus maenas*, con actividad contra bacterias Gram positivas (Relf et al., 1999); existen además proteínas como las penaeidinas, las cuales tienen una estructura molecular única, que consiste en un péptido líder seguido de un dominio N-terminal rico en residuos de prolina y un dominio C-terminal rico en residuos de cisteína. La familia de las penaeidinas actualmente consta de 5 miembros y todas están relacionadas con actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y hongos (Destoumiex et al., 2000). Estas proteínas se almacenan en los gránulos del camarón y son liberadas en respuesta a estímulos bacterianos, sin embargo la transcripción de penaeidinas no parece ser inducida por infección microbiana y los niveles de mRNA aumentan ligeramente solo a las 48 horas posteriores al encuentro bacteriano. La expresión y distribución de las penaeidinas después del reto microbiológico parece estar regulada a través de reacciones de hemocitos en el proceso de proliferación, además pueden estar implicados en la protección local una vez que son liberadas por los hemocitos y tienen la propiedad de unirse en el sitio de lesión, con lo que podría contribuir al proceso de cicatrización de una herida (Destoumiex et al., 1999).

2.4 Lectinas

Una característica esencial en la inmunidad de cualquier ser vivo es el desarrollo de la habilidad de distinguir lo propio de lo extraño. Existen moléculas con función de reconocimiento a lo no propio y se ha descrito un grupo de proteínas denominadas lectinas (del latín *legere*, seleccionar). Las lectinas tienen la capacidad de reconocer específicamente a los oligosacáridos de la superficie de las membranas de las células y consecuentemente inducen su aglutinación, además desencadenan diversos efectos como la fagocitosis actuando como opsoninas (Marque et al., 2000; Sahoo et al., 2007). Las lectinas en el suero tienen características estructurales y especificidad igual a la de la lectina insoluble presente en la membrana de los hemocitos. Se ha identificado la presencia de lectina tanto en la membrana celular como en los gránulos citoplasmáticos (Vazquez et al., 1997). En la hemolinfa de *M. rosenbergii* se describió una lectina de 19 KDa, específica para residuos de azúcares N- y O- acetilados, y con anticuerpos monoclonales (Agundis et al., 2000) se le identificó en las membranas de hemocitos circulantes, lo cual indica que la lectina es producida por los hemocitos, expresada en la superficie de su membrana, para realizar funciones de reconocimiento (Vázquez et al., 1997) y liberada a la hemolinfa, donde además del reconocimiento, realiza funciones de transporte de carbohidratos (Zenteno et al., 2000).

La síntesis de la lectina es atribuida a diferentes órganos de los crustáceos y podría activarse por un proceso infeccioso causado por virus o bacterias. Independientemente de que órgano exprese la lectina en los crustáceos, estas

proteínas parecen ser constitutivas e inducibles (de manera similar a las proteínas de fase aguda en vertebrados) y posiblemente podrían estar involucradas en la respuesta inmune contra infecciones por microbios y resistencia a los virus, induciendo procesos de aglutinación y opsonización (Vázquez et al., 1994, 1996). Las lectinas que se han identificado en crustáceos no presentan relación estructural entre ellas, ya que algunas están constituidas de diversas unidades y poseen pesos moleculares distintos como el descrito en *M rosenbergii* (Pereyra et al., 2004) Sin embargo se ha observado que en grupos de animales, preservan la capacidad de reconocer e interactuar con carbohidratos de estructura similar; por ejemplo las lectinas de crustáceos reconocen una serie azúcares con similitud estructural como la N-acetil-galactosamina (GalNac), N-acetil-glucosamina (GlcNac), Acido N-acetil-neuramínico (Neu5Ac) y el ácido O-acetilsialico (Neu5,9Ac2), estos datos sugieren que el reconocimiento de este tipo de azúcares se ha mantenido en las lectinas de crustáceos a lo largo de la evolución (Vasta et al., 2007).

2.5 Sistema proPO

En invertebrados se encuentra un mecanismo de defensa denominado sistema de proPO, el cual presenta similitudes funcionales con el sistema del complemento. Su activación requiere una serie de reacciones enzimáticas concatenadas; este sistema enzimático puede ser activado por LPS o por β -glucanos, provocando la desgranulación (Söderhäll et al., 1996). El precursor enzimático de la cascada es la profenoloxidasa (proPO), se produce en hemocitos de forma inactiva, después

se libera al hemocele, y su activación requiere de Ca^{2+} . La fenoloxidasasa (PO) cataliza la reacción donde la tirosina es convertida a dihidroxifenilalanina (DOPA) y la DOPA a Dopa-quinona un precursor de la melanina. La melanina es un pigmento negro-parduzco con diversas propiedades biológicas como la inhibición de la actividad de enzimas de hongos y bacterias. Se ha demostrado que la relación que existe entre la exocitosis del contenido granular de los hemocitos y la actividad de la proPO en el cangrejo *P. lenisculus* (Aspan et al., 1997) por activación por moléculas como LPS, amplificando la señal y resolviendo la infección. Algunas moléculas como la laminarina y el LPS inducen desgranulación de hemocitos grandes activando la proPO, la secreción de este contenido granular está acompañado de diversos factores, como el factor de adhesión, el cual se une inespecíficamente sobre la superficie de los microorganismos invasores, como a las hifas de los hongos (Söderhäll et al. 1984). Se ha aislado una proteína de adhesión del cangrejo de agua dulce *Pacifastacus leniusculus* con un peso molecular de 76 KDa y un punto isoeléctrico de 7.2. En células adheridas *in vitro* estas proteínas de adhesión estimulan varias respuestas inmunes como la encapsulación y la fagocitosis (Cerenius et al. 2004). La unión de estos factores induce la amplificación del sistema de proPO, provocando la desgranulación de células pequeñas y grandes. Se han encontrado proteínas en invertebrados como la $\alpha 2$ -macroglobulina que tiene una estructura dimerica que contrasta con la forma tetrameric que está presente en los mamíferos; estas proteínas conservan dominios internos tioester que han sido conservados casi idénticos, en organismos alejados como los cangrejos, cangrejos herradura y los seres humanos. Algunos de estos dominios se encuentran presentes proteínas del complemento C3 y C4,

que en forma conjunta con otras proteínas presentes en la hemolinfa provocan lisis celular (Enghild et al. 1990).

3 Receptores celulares de patógenos (PRRs)

3.1 Proteínas de enlace a β -glucanos (BGBPs), proteínas de unión a peptidoglicanos (PGBPs), proteínas de unión a lipopolisacárido (LGBPs).

Las rutas de activación de los mecanismos de defensa se basan en el reconocimiento de lo no propio (Figura 1) e implican diversos elementos, como las proteínas de enlace a β -glucanos (BGBPs), componentes importantes del sistema inmune, éstos se unen a β -glucanos formando un complejo que es reconocido por un receptor de superficie de los hemocitos, provocando desgranulación de la célula y activación del sistema de la proPO. Se ha demostrado, por clonación, la presencia de los receptores de peptidoglucanos (PGBPs) codificados en el DNA de decápodos (Padi et al., 2008) que la unión con los PNG con sus receptores forman un complejo que activa la proPO y que este reconocimiento desencadena uno de los distintos mecanismos de activación; los receptores se han conservado desde los insectos hasta los mamíferos (Koizumi et al. 1999). Los BGBPs se han caracterizado en diferentes especies de invertebrados, en especial de crustáceos, y que ésta proteína, al reconocer los β -1,3-glucanos, incrementa la actividad de la fenoloxidasa (Lee et al. 2000). Otros antígenos como los lipopolisacáridos (LPS) al ser reconocidos por proteínas en los hemocitos (LGBPs) inducen la formación de nódulos. Recientemente se ha encontrado que proteínas como LGBP y BGBP presentan una reducida actividad de glucanasa, esto sugiere que algunos de estos

receptores de glucanos podrían tener precursores en las glucanasas, al perder paulatinamente la actividad enzimática (Padi et al. 2008), manteniendo la función de reconocimiento. Se ha clonado el cDNA de LGBP y BGBP de hemocitos de *Litopenaeus vannamei*, y se encontró similitud con supuestos motivos de unión de integrinas y con supuestos motivos de unión de enlaces b1-3 de polisacáridos, por otro lado, demuestran que la expresión del gen de LGBP se incrementa en hemocitos tras el reto del camarón con *Vibrio alginolyticus* (Cheng et al., 2005).

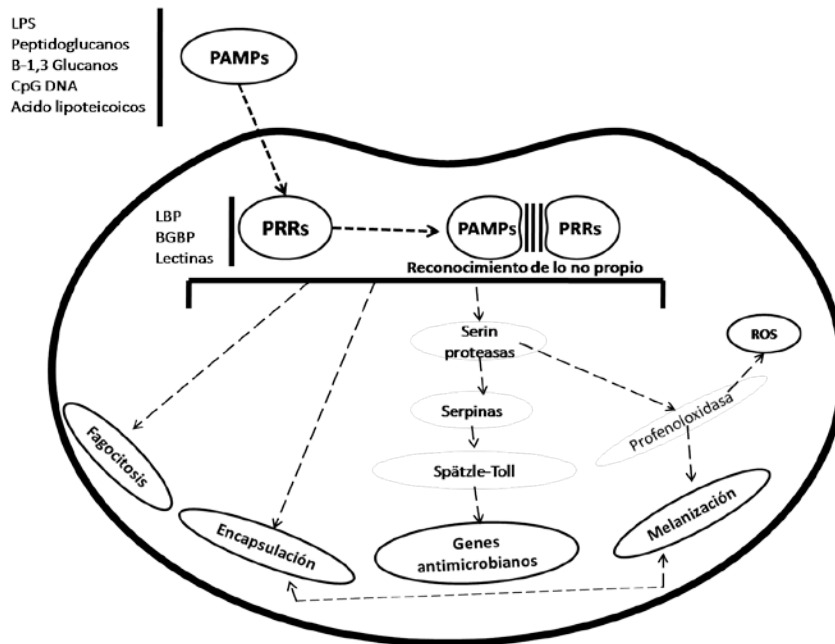


Figura 1.- Mecanismos efectores de los PRRs. (PAMPs, Patrones moleculares asociados a patógenos. PRRs, Patrones de reconocimiento de patógenos. LPS, Lipopolisacárido. ROS, Especies reactivas de oxígeno)

3.2 Receptores tipo Toll

Originalmente, fueron identificadas en *Drosophila*, como proteínas relacionadas con la reorganización dorso ventral en el estado de pupa, posteriormente se demostró su participación en la inmunidad contra hongos y bacterias Gram positivas (Lematre et al. 2003; Rutschmann et al. 2002). En mamíferos, la familia de receptores tipo Toll (TLRs) son receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PPRs) con un amplio patrón de moléculas de reconocimiento. Los receptores tipo Toll, son proteínas transmembranales que comparten un elemento estructural, constituidos por motivos estructurales denominados LRR (del inglés *leucine-rich repeats*), segmentos repetitivos de 24 a 29 aminoácidos que contienen la secuencia xLxxLxLxx (donde x es cualquier aminoácido y L es leucina). Mientras que su dominio intracelular se denomina dominio TIR (de Toll/IL-1 receptor) por alusión a la similitud entre los dominios citoplasmáticos de los TLR y la región comparable de un receptor de IL-1,. En *Drosophila*, la activación del receptor por el factor Spätzle quien regula la transcripción de genes específicos que inducen la síntesis de péptidos antibacterianos como la atocina y antifúngicos como la drosomicina. La vía de traducción del sistema Toll de *Drosophila* muestra una notable similitud con la vía de traducción de interleucinas en mamíferos (IL-1), que se asocia con la con la activación del factor de transcripción NF-κB. Responsable de múltiples eventos inmunes e inflamatorios. En hemocitos de camarón *L. vannamei* se identificó la presencia de receptores pertenecientes a la familia de los receptores tipo Toll (Li-Shi et al. 2007)

Se han encontrado proteínas de vertebrados con semejanza estructural a diversas proteínas de invertebrados; Los reportes de proteínas con similitud a receptores de interleucinas, estas interleucinas o citocinas son proteínas de bajo peso molecular que regulan las interacciones y funciones de las distintas células al ser reconocidas por su receptor, en vertebrados. Raftos et al., (1991) describieron el efecto de moléculas que inducen proliferación como la interleucina 2 y la fitohemaglutinina sobre células de estrella de mar *Styela clava*, lo que sugiere la presencia de algún tipo de receptor que promueva la proliferación.

4 Interleucina 2 (IL-2) y su receptor (IL-2R)

La interleucina 2 es una proteína de 14-17 KDa que es sintetizada por los linfocitos T, necesaria para la supervivencia proliferación y diferenciación de los linfocitos T activados por antígeno, además de que induce la síntesis de otras citocinas, con efectos autocrinos y paracrinos. Actúa sobre linfocitos NK, permitiendo su diferenciación y proliferación. Para realizar sus funciones la interleucina 2 necesita de un receptor de membrana (IL-2R), conformado por tres subunidades con distintas constantes de disociación, las 3 subunidades (Figura 2) son IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ (CD132), solo la subunidad alfa (CD25) es característico del receptor de IL- 2 y que le da la gran afinidad por su ligando al interactuar con las otras 2 subunidades, las otras son proteínas comunes y que se encuentran en otros receptores (Kuby, 2007)

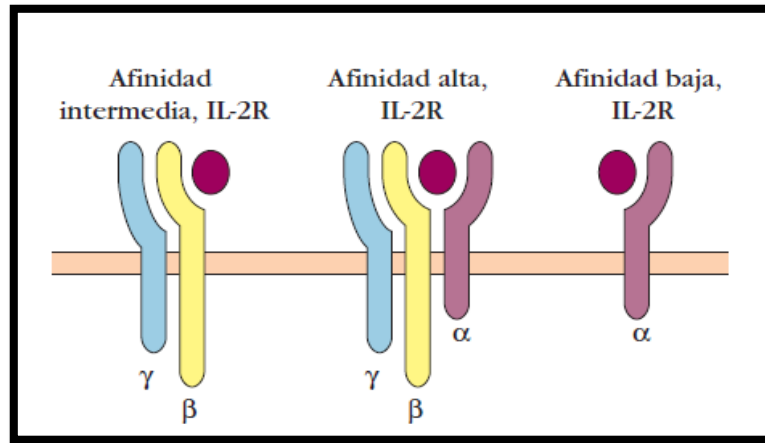


Figura 2.- Receptor de interleucina 2, con las 3 subunidades α , β , γ . Tomada de Inmunología de Kuby. 2007

La IL-2R α (CD25) es una proteína constituida por 272 aminoácidos, la cual consta de 2 dominios, D1 (1-64 residuos) y D2 (residuos 101-164), separados por 42 residuos interdominio (residuos 65-103) y en el segundo dominio del C terminal, una serie de 54 residuos que conduce a la membrana celular (165-217 residuos). Estas secuencias de interdominio y de conducción a la membrana no contribuyen a la unión del ligando; por lo que solo se consideran 120 residuos (D1 y D2) como estructura extracelular de reconocimiento (Figura 3). Cada uno de los dominios extracelulares expone alrededor del 30% de sus aminoácidos homólogos, entre los que están secuencias de un gripo denominado β -sandwich con dominios llamados dominios "Sushi", también se conocen como proteínas de control de complemento (CCP), módulos o repeticiones cortas de consenso (SCR) (Baron et al., 1991). Los dominios "sushi" de IL-2R alfa D1 y D2, presenta un estructura elíptica de " β sándwich", que contiene varios residuos altamente conservados en distintas proteínas (Shackelford et al., 1986).

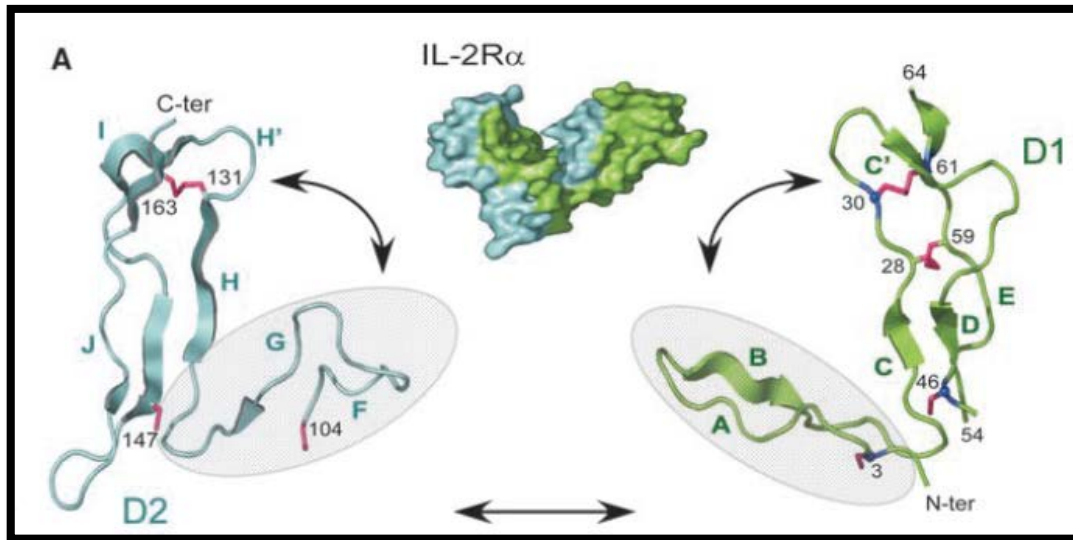


Figura 3.-. Dominios D1 y D2 de IL-2R α en un modelo tridimensional y su interacción entre los dominios se muestra al centro. (Rickert 2005)

Debido al papel central de la señalización de IL-2 en la activación de la respuesta inmune de linfocitos T, son un tipo de glóbulos blancos que componen parte del sistema inmunitario. Estas células ayudan al cuerpo a combatir enfermedades o sustancias dañinas. Las células T que participan en algunas condiciones patológicas tales como rechazo de aloinjertos de órganos (Rubin et al., 1990, Waldmann 2007) algunas enfermedades autoinmunes (Waldmann 1989, 2003), y leucemia de células T (Waldmann 1986). El papel crítico de la IL-2R α en la activación y su patrón de expresión específico, funciona como blanco de estudio y un objetivo clínico. Se ha demostrado que el bloqueo de IL-2R α puede interferir con las interacciones entre la IL-2 e IL-2R y por lo tanto inhibir la IL-2 vía de señalización, lo que resulta en la inhibición de la respuesta inmune. Con base a esto se han desarrollado anticuerpos contra la IL-2R α , para usarse como terapia

para la prevención del rechazo de aloinjertos en el trasplante de órganos, especialmente en el trasplante de riñón, como ejemplos están los productos Basiliximab (Simulect, Novartis Pharmaceuticals, East Hanover, NJ) y Daclizumab (Zenapax; Roche, Basilea, Suiza), ambos han sido aprobados Food and Drug Administration (FDA, USA). Basiliximab es anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano con el dominio variable del anticuerpo anti-IL-2RA murino y la fracción constante de IgG1 humana (κ) (Kahan et al., 1999) ha tenido gran éxito en la prevención del rechazo de aloinjerto renal (Tang et al., 2007). Este anticuerpo se une específicamente al ectodominio de IL-2R α . El epítipo reconocido por el basiliximab fue asignada a residuos dominio D1 de IL-2R α , que es parte de la interacción con IL-2 y de este modo se explica en parte por qué la unión de basiliximab con IL-2R α puede bloquear la señalización de IL-2 (Hui Yang et al., 2010). Sin embargo, el mecanismo molecular detallado de la inhibición de la IL-2 de señalización por basiliximab no está claro. En comparación el basiliximab reconoce al dominio D1 y el Daclizumab reconoce tanto a D1 como a D2, ambos bloquean la interacción de la IL-2 con la subunidad alfa. Esta inhibición se muestra en la figura 4, donde se ha propuesto la interacción de los anticuerpos humanizados contra la subunidad α (Jiamu Du et al., 2010)

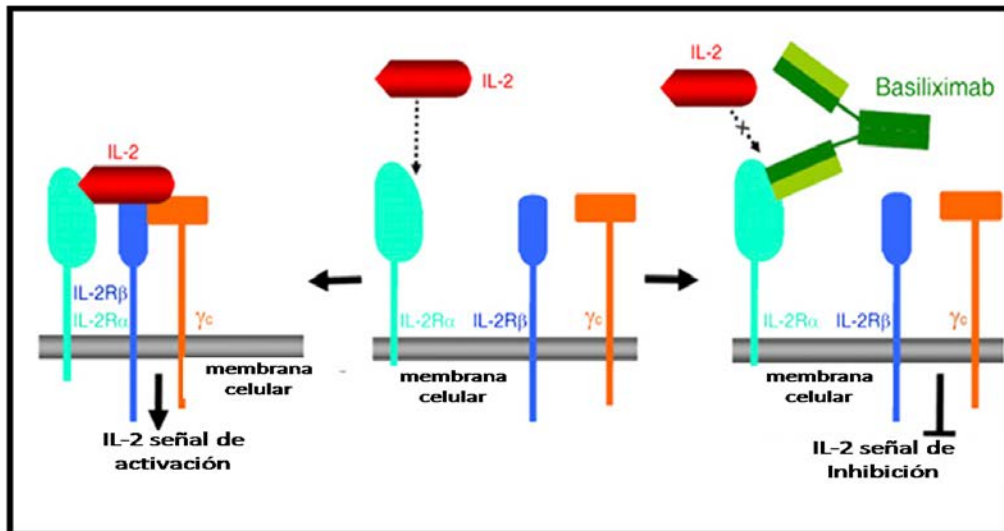


Figura 4.- Inhibición de la interacción de la IL-2 con la subunidad α . Tomada de: Jiamudu, *J Immunol* 2010; 184:1361-1368

5 IL-2R en invertebrados

Se han reportado proteínas que están presentes en los hemocitos, con semejanza estructural al receptor de interleucina 2, obteniendo marcaje positivo en hemocitos granulares, una de las dos poblaciones de hemocitos detectados en el molusco *Mytilus galloprovincialis* (Barcia et al. 1999), Cao et al., (2003) describen el efecto de la adición de interleucina 2 a un cultivo de hemocitos, observando un aumento en la expresión de CD25, pero aumenta más al emplear un antígeno como el LPS, posiblemente funcione como molécula de reconocimiento a lipolisacáridos o tengan epitopos compartidos con el receptor de LPS. Aunque otros efectos mecanismos efectores que provocan, como la producción de Oxido nítrico (NO), en donde la IL-2 provoca mayor síntesis y liberación de NO que el efecto mostrado por el LPS (Novas et al., 2004), esto sugiere que es posible que exista un receptor con semejanza a CD25 y posiblemente esté involucrado en

desencadenar un mecanismo de defensa al reconocer un ligando. Se ha determinado que la interacción de la IL-2 con su receptor en hemocitos de tipo granular del invertebrado *Mytilus galloprovincialis* (Barcia et al., 2011), desencadena una serie de reacciones basada en reacciones de cinasas aun no completamente determinada, se ha determinado que los hemocitos de tipo hialino son negativos a CD25 aun después de estimular esta poblaciones (Barcia y Martínez, 2008) Debido a la gran cantidad de patógenos que pueden afectar a los hemocitos en invertebrados, las células deben desempeñar múltiples funciones, tanto en el reconocimiento de lo extraño y en mecanismos efectores, que detengan y eliminen la infección, en la resolución de la infección pueden existir mecanismos de reconocimiento, con proteínas presentes en hemocitos, que pueden ser sintetizadas o estar preformadas.

II HIPÓTESIS:

- Los hemocitos de la langosta *Cherax quadricarinatus* expresan proteínas con similitud a la subunidad α del receptor de interleucina 2 (IL-2R α) que probablemente participen en los mecanismos de defensa.

III OBJETIVO:

- Caracterizar la presencia de proteínas semejantes a IL-2R α en hemocitos de langosta australiana *Cherax quadricarinatus*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener el medio adecuado para el cultivo primario de hemocitos.
- .Identificar las poblaciones celulares en con tinción de hematoxilina.
- Purificar el anticuerpo monoclonal anti- IL-2R α a partir de cultivo celular.
- Acoplar en anticuerpo monoclonal a Peroxidasa y FITC.
- Identificar la proteínas semejantes a IL-2R α

IV MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Líneas celulares

Se utilizó la línea celular PC61 (ATCC® Numero: TIB-222™) hibridoma de linfocito B, la cual produce el anticuerpo monoclonal de tipo IgG₁ dirigido contra la subunidad α(CD25) del receptor de interleucina 2, células Jurkat (ATCC® Numero: TIB-152™) leucemia de linfocito T que expresa CD25, fueron proporcionada por la Facultad de Medicina, UNAM⁽¹⁾.

2. Organismos

Se utilizaron langostas australianas de la especie *Cherax quadricarinatus*, machos adultos, en estado de intermuda, provenientes de la unidad acuícola “El Higuero” Jojutla, Morelos, donde son cultivados en estanques rústicos, se mantuvieron en el laboratorio en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y salinidad durante 4 semanas antes de su utilización para reducir el estrés provocado por el traslado.

Se utilizaron ratones de la cepa Balb-c hembras de entre 20-30 g de peso.

3. Propagación del cultivo celular

Las células del hibridoma PC61 crecieron en medio DMEM (Gibco, USA) complementado con Penicilina/Estreptomicina 100UI/ μ L-10mg/ μ L (Sigma fine chem, st Louis Mo. , USA), y SFB (Hyclone, USA) al 10 %, en atmosfera de 95% de aire y CO₂ al 5 %, a una temperatura de 37°C, donde se sembraron 5x10⁶ células/botella de cultivo de 25cm². Las células Jurkat se propagaron en medio RPMI 1640 (Gibco, Gran Island, N.Y, USA) complementado con Penicilina/Estreptomicina 100UI/ μ L-10mg/ μ L (Sigma, USA), y Suero Fetal Bovino (Hyclone, South Logan, Utah USA) al 10 %, en atmosfera de 95% de aire y CO₂ al 5 %, a 37°C, se sembraron 5x10⁶ células/botella de cultivo de 25cm².

4. Producción del líquido de ascitis

Con el cultivo del hibridoma PC61 en estado de confluencia se centrifugaron las células a 1200 rpm durante 10 min a 4°C, el botón celular (10⁶ células/mL) se mezcló con Pristano (2, 6, 10, 14-Tetrametilpentadecano) en relación 1:1 y en un volumen no mayor de 0.5 mL, se inyectan en el peritoneo de ratones hembras Balb/c. El líquido de ascitis se recolectó 2-3semanas después de la administración de las células, tiempo que tarda en formarse el tumor.El líquido de ascitis se obtiene por punción peritoneal y se recolecta en tubos estériles, si se desea recuperar las células, del líquido de ascitis este se centrifuga a 1200 rpm/10 min a

4°C; en el sobrenadante se encontrarán los anticuerpos que se almacenarán en alícuotas a -70°C hasta su posterior utilización, las células del fondo del tubo se pasan a una botella de cultivo con medio complementado-10%

5. Purificación del Anticuerpo monoclonal (Anti-CD25)

Se precipitaron los anticuerpos del sobrenadante de ascitis según el método descrito por Harlow & Lane (1998), el material se centrifugó (Sorvall® Fresco) a 12000 g por 30 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un vaso de precipitado y con agitación suave, se agregó lentamente solución saturada de sulfato de amonio hasta obtener una concentración de 33% de saturación y se mantuvo la preparación a 4°C toda la noche. Se centrifugó el precipitado a 12000 g 30 min, se desechó el sobrenadante y el botón se suspendió en 10 mL de solución balanceada de fosfatos (PBS Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaCl , 0.15mM, pH 7.2). Se repitió dos veces más el proceso de precipitación y finalmente se resuspendió el botón en 2 mL de PBS, transfiriendo ese volumen a un tubo de diálisis y dializándose exhaustivamente contra PBS, hasta la eliminación del sulfato de amonio. El sobrenadante conteniendo los anticuerpos monoclonales se centrifugó a 12000 g/ 20 min a 4°C, se eliminó el precipitado conteniendo proteínas desnaturalizadas permaneciendo en el sobrenadante los anticuerpos monoclonales, se les determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA, Sigma fine chem, st Louis Mo, USA) como estándar y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

El anticuerpo monoclonal se acopló a Peroxidasa (Avrameas 1971) o a isotiocianato de fluoresceína (FITC; Sigma fine chem, st Louis Mo, USA) (Riggs et al., 1958)

6. Acoplamiento del Isocianato de fluoresceína (FITC) al anticuerpo monoclonal (Anti-CD25)

Para el acoplamiento se utilizó el anticuerpo purificado por precipitación dializando la proteína contra amortiguador de carbonatos (Na_2CO_3 0.06M, NaHCO_3 0.03M) pH 8.5 y agregándole FITC (Sigma) 0.5 mg por cada mg de anticuerpo, disuelto en el mismo amortiguador. Se incubó toda la noche a 4°C con agitación constante. El FITC no acoplado se separó del conjugado por filtración en una columna de Shepadex G-25 equilibrada previamente con PBS pH 7.2.

7. Acoplamiento de peroxidasa al anticuerpo Anti-CD25

Se utilizó la técnica de Avrameas (1971), Se disolvieron 10 mg de peroxidasa tipo VI en 0.2 mL de glutaraldehido 1,25% en PBS, se mezcló la muestra y mantuvo a temperatura ambiente durante 18 h, posteriormente, se ajustó el volumen a 1 mL con solución salina 0.15M y se dializó contra la misma solución. Se mezcló la

enzima activada con 5 mg de anticuerpo. Enseguida se adicionó 0.1 mL de Na_2CO_3 1M pH 9.5. Se mezcló y se dejó reposar durante 24 h a 4°C. Transcurrido el tiempo, se agregó 0.1mL de L-lisina 0.2M y se mantuvo en reposo durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se dializó 24 h contra PBS pH 7.2

8. Obtención de Hemolinfa y células.

La obtención de hemocitos se realizó por extracción con jeringa de 3 mL calibre 21g x 32mm con anticoagulante para crustáceos (100mM glucosa, 20 mMNaCl, 30 mM Citrato de Sodio puncionando el seno pericardial) en relación de 1 mL de anticoagulante para crustáceos por 1mL de la hemolinfa conteniendo los hemocitos y manteniendo la mezcla a 4°C hasta su uso. A las células se les realizó una tinción de hematoxilina- eosina.

9. Viabilidad Celular:

Para determinar la viabilidad celular se tomó una alícuota de plasma y se realizó un conteo total de células en un hematocitómetro. Se colocaron en tubos eppendorf de 200 μ L de plasma, conteniendo 2×10^5 hemocitos, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a 4°C, enseguida se resuspendió el paquete celular en 500 μ L de diferentes reactivos medios DMEM, RPMI (Gibco, USA) ambos

medios complementados con antibióticos y glutamina, solución de Alsever (Dextrosa 20.05 g/L, Citrato de sodio.2H₂O 8 g/L, Acido cítrico.H₂O 0.55g/L, NaCl 4.20 g/L), PBS, Solución salina isotónica (SSI; NaCl 0.9%) un tubo se volvió a suspender el plasma del cual se extrajeron los hemocitos y se utilizará como control, después se toman 100µL de las suspensiones y se colocan en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma) delimitando la superficie con marcador hidrofóbico ImmEdge Pen (Vector Laboratories, UK, H-4000), enseguida se incubaron a 4°C por distintos lapsos de tiempo (5, 10, 15 ,20, 30 ,45 min) en cámara húmeda. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron 10µL de Azul tripán al 0.1% en solución salina isotónica 0.9% y se colocaron en cubreobjetos sellados con barniz y se observan en un microscopio invertido Olympus IMT-2 (Tokio, Japón) y se realizan conteos de 100 células por campo visual, a diferentes aumentos; 10X, 20X y 40X por exclusión del colorante Azul tripán, registrando las imágenes con la cámara digital Olympus E-300 (Tokio, Japón) acoplada al microscopio.

10. Ensayos de Adhesión Celular:

Plasma conteniendo las células (100µL) y se centrifugaron a 1200 rpm a 4°C por 5 min, el botón celular se resuspendió en RPMI, se tomaron 100µL de esta suspensión celular y colocaron en portaobjetos tratado con poli-L-lisina, delimitando los pozos con marcador hidrofóbico e incubando en cámara húmeda a

4°C, para en seguida realizar la prueba de exclusión del colorante Azul tripán para determinar viabilidad y morfología con microscopio invertido a 10X, 20X y 40X.

Los ensayos de viabilidad celular, Inhibición de la actividad celular y adhesión celular se realizaron ensayos por triplicado y analizando 3 campos visibles y tomando una valor de 100 hemocitos totales.

11. Inmunocitoquímica:

Los hemocitos son extraídos y centrifugados a 1200 rpm a 4°C por 5 min, son suspendidos en 500µL de RPMI, se toman 100µL de esta suspensión y se colocan en portaobjetos tratados con poli-L-lisina delimitando pozos con un marcador hidrofóbico, se incuban a 28° por 15 min permitiendo la adhesión, se retira el exceso de suspensión y se fijan las células con paraformaldehído (PFH) al 4% en agitación constante a 4°C, se lavaron por 3 ocasiones con PBS pH=7.2 en agitación, posteriormente se incubaron con 200µL de solución de albumina al 5% en PBS para bloquear los sitios inespecíficos por 1 hora a 37°C, se lavaron dos veces con PBS. Para permeabilizar las células se incubó con Tritón X-100(Sigma, USA) al 0.2% en PBS, se lavaron las células 2 veces con PBS para, en seguida incubar con el anticuerpo acoplado a FITC (Anti-CD25-FITC) diluida 1:50 en PBS se transfirieron a una cámara húmeda en total oscuridad permaneciendo ahí por una hora a 37°C; posteriormente, los pozos se lavaron con PBS dos veces, para

visualizar los núcleos se montaron los portaobjetos en oscuridad con VectaShield conjugado con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratorios, USA) y se sellaron con barniz. Para determinar el reconocimiento hacia la subunidad α del receptor de interleucina 2(CD25) se utilizó la línea celular Jurkat que expresa esta subunidad tratándola de igual manera que los hemocitos de langosta. Se observaron en un microscopio Leica DM/SL (Weslar, GMBH) con aumentos de 10X, 20X, 40X y 100X, lámpara de fluorescencia acoplada al microscopio y filtros específicos para tres canales, El registro de las imágenes se realizó con la cámara digital Leica DFC-300FX (Cambridge, UK) acoplada al microscopio y finalmente se proyectaron las imágenes en una computadora mediante el programa Leica IM1000 versión 1.20 release 9 (Heerburg, Suiza).

12. Electroforesis (SDS-PAGE)

Para la electroforesis se utilizaron hemocitos centrifugados e incubados por 30 minutos a 4°C con amortiguador de lisis (inhibidor de proteasas, PMSF y tritón X-100 al 1%) en agitación constante La suspensión resultante se centrifugó a 12000 rpm 30 min, para eliminar residuos celulares, del sobrenadante se tomó una muestra conteniendo 100 μ g de proteína, y se realizó la electroforesis por el método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% con SDS, en condiciones reductoras. Las muestras se diluyeron en con amortiguador de muestra (Tris-HCl 75mM, glicerol 10%, SDS 2%, β -MSH 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8) en relación 1:1 y se sometió a ebullición en baño

María por 15 min. Se utilizaron estándares de peso molecular conocido de rango amplio y posterior tinción con azul de Coomasie para visualizar sus posiciones. La migración electroforética se realizó aplicando un voltaje constante de 100V, en amortiguador de corrida (Tris 0.025M, glicina 0.192M y SDS 0.1%, pH 8.3%).

13. Inmunoelectrotransferencia:

La Inmunoelectrotransferencia se realizó con el método descrito por Towbin et al (1979). Después de la electroforesis se incubo el gel en amortiguador de transferencia (Tris base 25mM, glicina 192mM y metanol 20%, pH 8.3) durante 1.5 h. La transferencia a membranas de PVDF, se realizo en un aparato Trans-Blot SD semiDry Transfer Cell (Bio Rad) a temperatura ambiente con voltaje constante (25V) por 1 h, en amortiguador de transferencia. Transferido el gel a la membrana de PVDF, se retiraron los pesos moleculares y tiñeron con amido negro en el resto de la membrana, se bloquearon los sitios reactivos libres con leche descremada al 5% en PBS durante 1.5 h a 37°C, posteriormente las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01% (PBS-T) 5 veces, en agitación, 5 minutos cada lavado. Se adicionó el anticuerpo acoplado a peroxidasa (Anti-CD25-P), en dilución 1:40 se incubó 1.5 h a 37°C, después del lapso de incubación se lava la membrana con PBS-T cinco veces, 5 minutos cada lavado. Para revelar se utilizo el kit de amplificación Opti-4CN (Bio-Rad) como se describe a continuación: Se incuba la membrana por 5 minutos con BAR (Bio-Rad amplified reagent), se lava 2 veces con PBS-T por 5 min cada vez, posteriormente se procedió a la detección

colorimétrica incubando la membrana por 30 min en una solución de Opti-4CN diluet y agua destilada en una relación 1:10 con 200 μ L de Opti-4CN substrate (4-choloro-1-naftol) por cada 10 ml de solución.

V RESULTADOS:

Las langostas se encontraban en un estado de intermuda tienen un duro exoesqueleto y no hay retracción pigmento epidérmico del exoesqueleto; permitiendo el manejo de los especímenes y posterior extracción de la hemolinfa, teniendo a la población en un estadio idéntico. (Peebles 1977)



Imagen 1.-Langosta australiana *Cherax quadricarinatus*

Tinción hematoxilina-eosina:

En la figura 5, se muestran los hemocitos teñidos con hematoxilina-eosina los que presentaron morfologías y tamaños similares. Se pueden apreciar al menos tres diferentes poblaciones, los de tipo hialino (CH) que no presentan gránulos de carácter básico, con un núcleo ácido de forma redonda y definida bque ocupa la mayor parte de su citoplasma. Los hemocitos de tipo granular (CG) con un núcleo ácido pero de menor tamaño respecto a su citoplasma y con gránulos básicos distribuidos en su citoplasma y los hemocito semigranulares (CSG) que presentan

un núcleo intermedio en comparación de las otras dos poblaciones y escasos gránulos básicos en el citoplasma.

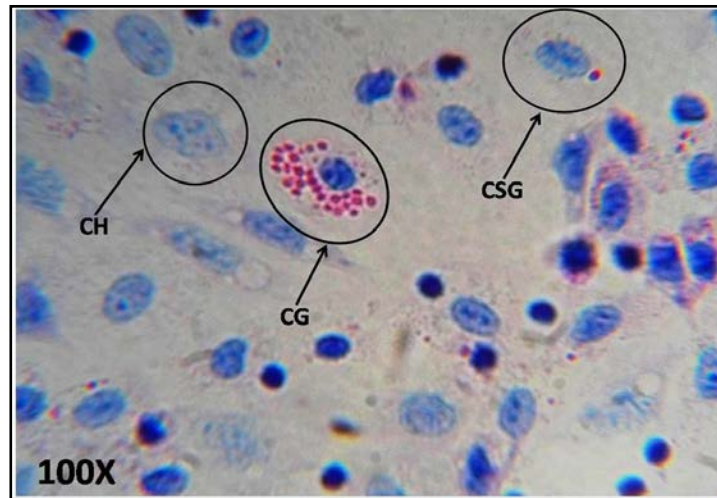


Figura 5.- Microscopia de luz, tinción de hematoxilina-eosina en la que se observan tres tipos de hemocitos, las de tipo granular (CG), las hialinas (CH) y las semigranulares (CSG). 100X de aumento.

Viabilidad celular:

La prueba de las condiciones idóneas para la sobrevivencia de los hemocitos (DMEM, RPMI, SSI, PBS, solución Alsever) fueron comparadas con el plasma recién extraído como control, excluyendo a los hemocitos teñidos de azul (muertos) en los cuales penetra el colorante Azul tripán y a las viables los hemocitos traslucidos, se compararon las medias de los ensayos realizados por triplicado.

En la figura 6 se observa que en el medio DMEM los hemocitos presentaron una viabilidad de 78%. En el medio RPMI, 88% de viabilidad celular y predominio de

las poblaciones de CSG sobre las otras poblaciones. En el amortiguador PBS 1X permitió una viabilidad de 44%. En SSI presento 67% de viabilidad; mientras que en la solución de Alsever solo hubo viabilidad del 5% además, no hubo adhesión celular en los portaobjetos, este mismo efecto se observó con la hemolinfa presentando una viabilidad del 90%.

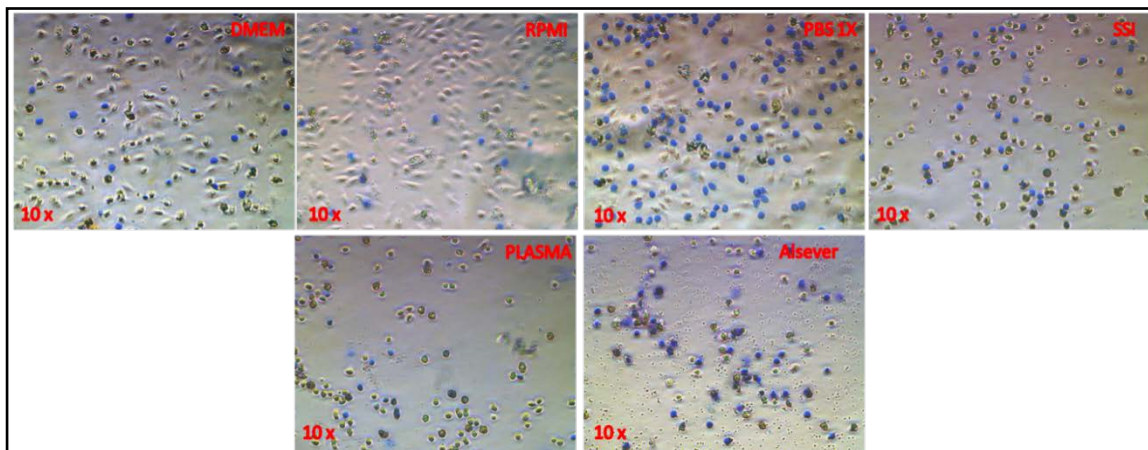


Figura 6.- Viabilidad celular de hemocitos por exclusión del colorante azul tripan al 0.1%, en cámara húmeda, microscopia luz normal, aumento 10X.

Adhesión celular:

En la prueba de adhesión la morfología observada en la figura 7, corresponde a los tipos celulares CH, CG y CSG, a los 5 minutos hay una viabilidad de 89% en las células adheridas. Solo son consideradas las que modifican su morfología extendiéndose en la superficie. A los 10 min se observó mayor adherencia y viabilidad de 85%, al minuto 15 la viabilidad fue de 80%, a los 20 minutos la adherencia se mantiene constante mientras que la viabilidad disminuyó a 70%. Al

minuto 30 la cantidad de hemocitos adheridos es menor que la observada en el minuto 20 y la viabilidad fue de 60%, al minuto 40 la adherencia disminuyó y la viabilidad se redujo a 50%, a los 50 minutos la adherencia se mantuvo y la viabilidad fue de 30%.

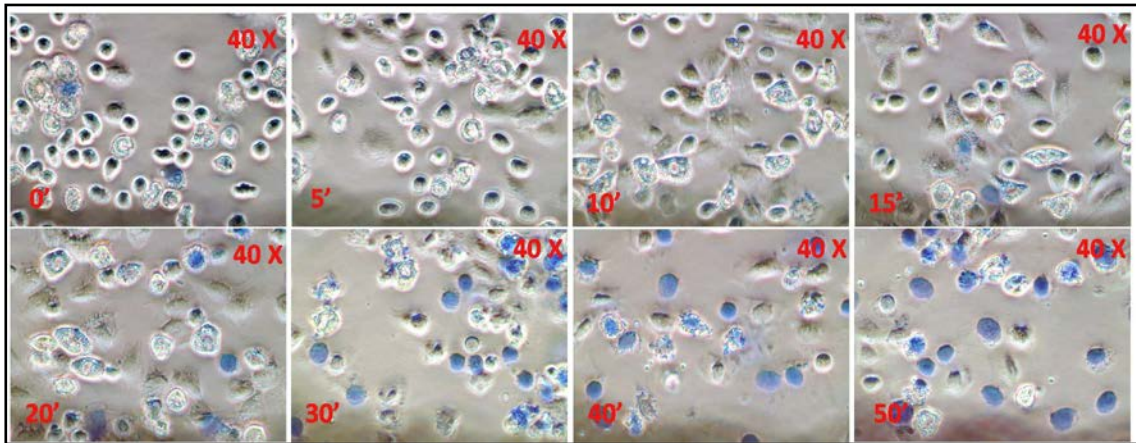


Figura 7.- Adhesión celular por exclusión del colorante azul tripan al 0.1%, a la adhesión de hemocitos a 28°C en cámara húmeda a diferentes tiempos 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 50 minutos, microscopia luz normal, aumento 40X.

Inmunocitoquímica:

Los datos obtenidos por Inmunocitoquímica para detectar el reconocimiento de Anti- CD25 (Anti-CD25-FITC) hacia los hemocitos de langosta se observa en la figura 8, un reconocimiento positivo tanto en hemocitos granulares como semigranulares y marcaje negativo en los hialinos. Se utilizaron células Jurkat

(CD25+) como control positivo y hemocitos sin anticuerpo como control negativo. La señal positiva es de mayor intensidad en hemocitos granulares y con emisión de fluorescencia en los gránulos delimitados en el citoplasma.

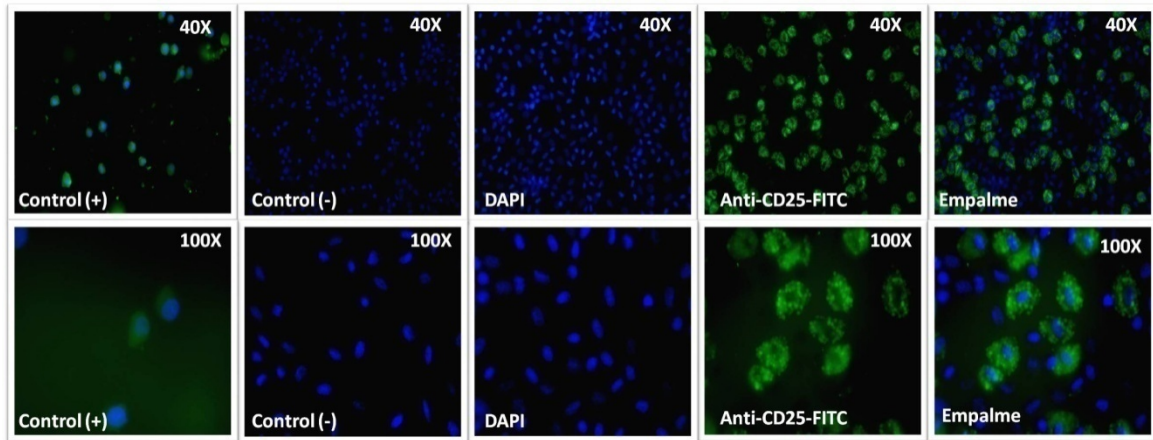
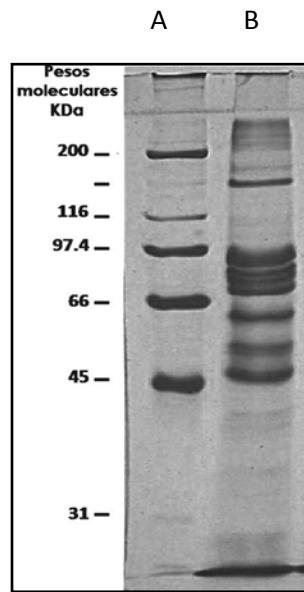


Figura 8.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *C. quadricarinatus* marcados con AntiCD25-FITC (verde) y DAPI (Azul), control positivo Jurkat, control negativo hemocitos sin anticuerpo.

Electroforesis SDS-PAGE

En la siguiente figura se observa la migración electroforética del lisado total de hemocitos, que mostro múltiples bandas con pesos moleculares que fluctuaron entre 200 y 31 KDa., de la mayoría están presentes y con una intensidad mayor entre 97 y 45 KDa; seguidas de 97 a 200 KDa y por ultimo en menor intensidad las de rango bajo de entre 45 y 21 KDa.



- A) Marcadores de peso Molecular
- B) Lisado celular de Hemocitos de *Cherax quadricarinatus*

Figura 9.- Electroforesis SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomassie.

Inmunoelectrotransferencia

Con la finalidad de identificar las posibles proteínas relacionadas con CD25 en el lisado celular de hemocitos se realizó una Inmunoelectrotransferencia, se reveló con Anti-CD25-Peroxidasa en dilución 1:50, como se muestra en la figura 10 se observa una banda de 36 KDa.

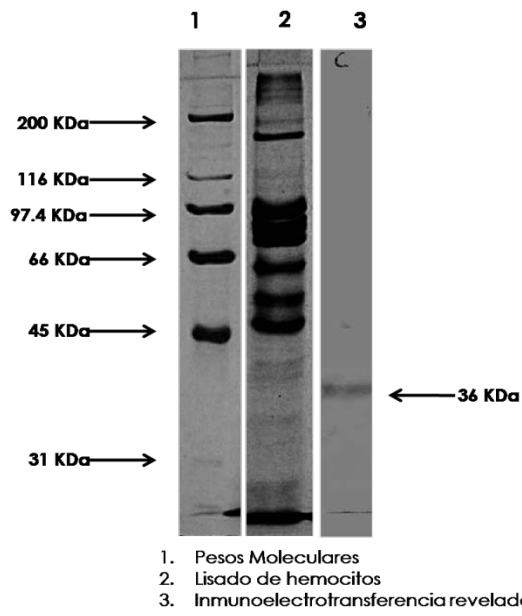


Figura 10.- Inmunoelctrotransferencia del lisado celular de hemocitos revelados con anti-CD25-P 1:50

V DISCUSION:

En invertebrados el papel que desempeñan los hemocitos en circulación es de una barrera celular de protección de los crustáceos contra microorganismos invasores, además de su participación en los diferentes mecanismos de inmunidad (Cerenius and Söderhäll, 2004). En general, los crustáceos presentan diferentes tipos de hemocitos, células hialinas (CH), células semigranulares (CSG), células granulares (CG), en la hemolinfa: Los hemocitos intervienen en la inmovilización y destrucción de los patógenos invasores (Johansson et al; 2000), otros reportes han encontrado similitudes morfológicas para estas células (Lavine et al., 2002). Un aspecto importante en los invertebrados (crustáceos) es que poseen un repertorio limitado de células circulantes involucradas en los diferentes mecanismos de defensa, además la falta de marcadores específicos para los hemocitos, limita a la utilización de poblaciones heterogéneas y no poder estudiar a los conjuntos por separado. Además el cambio de estadio de acuerdo a la estación del año o periodo de reproducción interviene en las características morfológicas y por ende inmunológicas, uno de los estadios estables y largos, es el estado de intermuda el cual, se caracteriza por la dureza del caparazón que permite manipular las langostas y su periodo de duración varía entre 29 y 79 días (Wickins y Beard, 1974), lo que permite mayor tiempo de manipulación y no están vulnerables como en un estado de postmuda en el cual el exoesqueleto es palpable y bastante flexible y no permite una manipulación eficiente y esta etapa dura de 3 a 5 días hasta la siguiente cambio de exoesqueleto.

El reconocimiento de lo propio de lo extraño es fundamental en la defensa de infecciones por patógenos, la presencia de proteínas de reconocimiento de este material extraño puede desencadenar en distintos mecanismo de defensa, que culmina en la eliminación del patógeno.

En la tinción de hematoxilina-eosina, se identificaron 3 poblaciones celulares de hemocitos en circulación, las células hialinas (CH), las semigranulares (CSG) y las granulares (CG), los hemocitos de tipo semigranular se encuentran en mayor cantidad, seguidas de células hialinas y por último las células granulares. Para su clasificación se tomó en cuenta exclusivamente la morfología, el tamaño y la presencia de gránulos básicos citoplasmáticos; La clasificación en base a las funciones que desempeñan es complicada debido a que diferentes grupos celulares tienen funciones similares, por ejemplo, las células CSG y CG tiene la capacidad de desencadenar la cascada de la proPO en cangrejo de agua dulce, las CG y CSG desarrollan funciones de encapsulación en hemocitos de insectos, mientras que las CH y CSG realizan fagocitosis en distintos crustáceos (Söderhäll 2010) es posible que con el reducido repertorio de células presentes, deban desempeñar múltiples funciones para mantener la homeostasis en el crustáceo, en comparación con las células de vertebrados que pueden ser mas especializadas.

Algunas de las funciones específicas que desempeñan los hemocitos, se han demostrado al separar las poblaciones, en el cangrejo *Carcinus maenas* se demostró que las CH tienen como función principal fagocitar, mientras que las CSG actúan en la detección temprana de patógenos (Söderhäll y Smith; 1983), mientras que las células de tipo granular, por su contenido de factores inmunes como la cascada de activación del sistema de profenoloxidasa (proPO),

peroxinectina, proteína de adhesión celular, crustinas, péptidos antimicrobianos (Sricharoen et al; 2005) participan en funciones de protección por la liberación de su contenido. Otras actividades basadas en el estímulo de los hemocitos, como la exocitosis efectuada por CSG y CG en respuesta a polisacáridos microbianos, lo que lleva a la liberación de proteínas inmunes (Lavine y Strand, 2002). Los anteriores estudios sugieren que las diferentes funciones que desempeñan las poblaciones de hemocitos, son características de cada tipo de crustáceo, no es posible una clasificación en base a sus mecanismos efectores, ya que presentan un efecto de pleiotropia, es decir un tipo particular de hemocitos pueden efectuar distintas funciones, o distintos hemocitos desarrollan una función en común, presentando redundancia. Aunque el estudio de los invertebrados se ha enfocado en gran medida al estudio de la hemolinfa, (fracción soluble o suero) y no la parte celular, por falta de conservación de los hemocitos por tiempos prolongados y analizar mejor su comportamiento así como los distintos mecanismos de defensa.

En invertebrados en general, el desarrollo de sistemas de cultivo celular ha tenido un éxito limitado (Power et al., 1998), estas fallas han sido relacionadas con la baja velocidad de proliferación celular y la falta de conocimiento sobre la presencia y eficiencia de los factores de crecimiento específicos. Mantenerlas vivas el mayor tiempo, requiere de un absoluto control de factores, como temperatura, osmolaridad y presencia de nutrientes idóneos (Lebel et al., 1996). Los medios de cultivo se han desarrollado en base a los nutrientes que necesitan los diferentes tipos celulares, la mayoría para células de vertebrados, la necesidad de encontrar medios de cultivo adecuados para el crecimiento de células de invertebrados marinos fue propuesta por Flandre desde 1971. Algunos medio de cultivo han

demostrado su eficiencia para preservar el cultivo de hemocitos, como el Leibovitz L-15, el cual presenta un efecto positivo en la preservación y estimulación de hemocitos de *Mytilus galloprovincialis* (Cao et al., 2002). Por otro lado, se ha reportado que el medio de cultivo RPMI puede mantener viables células de estrella de mar *Styela clava* por un lapso de 9 días, permitiendo determinar su proliferación celular por activación con diferentes estimulantes (Raftos et al., 1991).

Nuestros resultados indican que la viabilidad de los medios de cultivo RPMI y DMEM con respecto a la hemolinfa son comparables, las células tienden a mantenerse estables y viables; funcionarían como los medios adecuados para mantener a los hemocitos de *C. quadriarinatus* en cultivo para realizar los análisis posteriores, entre ellos la búsqueda de marcadores similares al CD25 y otro tipo de receptores. La viabilidad que se obtiene en los medios de cultivo es comparable con la obtenida con la hemolinfa la cual se mantienen alrededor de 90%, además en los medios permiten una mejor adherencia a la superficie, lo que facilita su análisis, el estado inducido por la baja temperatura no afecta procesos como la adhesión.

Las características que comparten los medios de cultivo en concentración, contenido de sales, aminoácidos, vitaminas y otros componentes; son similares; posiblemente, la mejora de la viabilidad del medio RPMI se debe a el contenido de distintas sustancias que beneficiarían a la célula,, estos componentes extras que contiene son, Vitamina B12, Acido p-amino benzoico, HEPES, y glutatión. Dentro de las sustancias que podrían desempeñar una función que intervendría a mantener mejor a los hemocitos, están las vitaminas que funcionan como

cofactores para distintas enzimas que desempeñan distintas funciones celulares, una de ellas la vitamina B12 que participa en la síntesis de purinas, proteínas y en la metilación del ADN entre otros (Park J and Kim J. 2012).

Las soluciones pueden mantener células de invertebrados con cierta estabilidad, preservándolas viables permitiendo trabajar con ellas, aunque en bajos periodos de tiempo, como PBS, Alsever y salina, pero no contienen lo mínimo necesario para mantener a los hemocitos viables por tiempos prolongados.

El estudio de la inmunidad en vertebrados e invertebrados, ha sugerido que los mecanismos de defensa en invertebrados podrían considerarse como precursores de la inmunidad de los vertebrados. Estos eventos requieren de la participación de los grupos celulares y de los factores humorales generados contra antígenos específicos, como se ha demostrado en mamíferos (Hoffmann et al., 1999; Iwanaga and Lee, 2005). En invertebrados los mecanismos de defensa dependen completamente del sistema inmune innato, que puede ser activado por diferentes moléculas, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por su siglas en inglés), son reconocidas por distintas moléculas solubles y de superficie, como las lectinas, péptidos antimicrobianos, proteínas de reconocimiento de patrones, que desencadenan la activación de los mecanismos celulares o humorales para la destrucción de los patógenos (Vázquez et al., 2009). En vertebrados, moléculas como las citocinas, proteínas de bajo peso molecular, secretadas por linfocitos y otras células inmunitarias, regulan la intensidad y la duración de la respuesta inmune, mediante diversos efectos entre ellas y otras células blanco (Kindt et al., 2007), en distintos invertebrados, se han encontrado moléculas con actividades relacionadas con la comunicación entre organismos,

como la feromona de protozoarios Er-1, y tienen una relación estructural y un efecto parecido al producido por la IL-2 (Roitt et al., 2003). Por otro lado, se ha identificado una citocina tipo IL-2 (IL-2-like) en las gallinas la cual presenta un 24% de homología estructural a la de humano y 70% con una gallina de Turquía, y que al utilizar anticuerpo monoclonal contra receptor de interleucina 2, identifica una proteína de 50 KDa y bloquea la actividad de la “IL-2-like”(Paul 2003).

Una de las formas de localizar y de identificar proteínas es utilizando anticuerpos contra las secuencias específicas de éstas, los anticuerpos que reconocen un solo tipo de epítipo, se les denomina monoclonales ya que lo producen un solo tipo de clona, los anticuerpos monoclonales son específicos, es decir no reconocen a otro epítipo, a menos que mantenga una similitud tanto secuencial como espacial. Anticuerpos de tipo murino han sido humanizados para poder utilizarse como terapia y evitar que sean reconocidos y eliminados, entre ellos los anticuerpos anti-IL-2R α , estos han demostrado que tienen la capacidad de unir ciertas regiones específicas del receptor y evitar la interacción de la IL-2 con su receptor (Hui Yang et al., 2010).

En este trabajo identificamos la presencia de proteínas que comparten epítopes con la subunidad α del receptor de interleucina 2 en hemocitos de langosta *Cherax quadricarinatus*, revelando su presencia exclusivamente en las células granulocíticas y en particular, almacenados en los gránulos de los hemocitos. El marcaje positivo en hemocitos de *C. quadricarinatus*, es similar al reportado en hemocitos granulares de mejillón (Barcia et al 1999); inclusive en cultivos primarios de hemocitos se ha detectado que en un estímulo con IL-2, aumenta la expresión de la subunidad α (Cao et al. 2003). Debido al repertorio limitado que

poseen los invertebrados (Bauchau 1981, Söderhäll 2010) estas células deben desempeñar un mayor número de funciones para subsanar la falta de repertorio celular con funciones específicas; esto nos plantea la posibilidad de que los gránulos contienen moléculas preformadas y almacenadas, que al recibir un estímulo, desencadenan una serie de eventos, como la desgranulación del contenido granular o translocar el contenido de los gránulos hacia la membrana, aumentando la densidad de proteínas, y con ello potenciando el reconocimiento o la activación celular. Algunos investigadores han propuesto medir funciones determinadas ya conocidas en mamíferos como la proliferación celular, en hemocitos esta estimulación se realizó por adición de interleucina 2 y/o fitohemaglutinina P en cultivos primarios de *Styela clava* (Raftos et al., 1991), otros lo han relacionado a distintos mecanismo de defensa, como el aumento en la producción de especies reactivas de nitrógeno (Novas et al., 2004) y otros en la reducción de la expresión de CD25 (Cao et al., 2004).

La presencia de esta proteína en *Cherax quadricarinatus*, se corroboró por la inmunoelectrotransferencia del lisado celular de hemocitos, en la que se identificó una banda de alrededor de 36 KDa, peso molecular que no coincide con el reportado en vertebrados, de aproximadamente 55 KDa. Existen reportes de proteínas identificadas con anticuerpos policlonales en invertebrados como *Mytilus galloprovincialis*, donde los hemocitos de tipo granular presentaban las tres subunidades del receptor, identifican proteínas de 50, 70 y 45 KDa respectivamente (Barcia et al., 1999). Sin embargo, no es posible asociar el tamaño de las proteínas encontradas con las proteínas de vertebrados, ya que los que los anticuerpos reconocen en una secuencia, y en vertebrados existe mayor

complejidad, queda la posibilidad de que las proteínas de invertebrados sean precursores de vertebrados, pero se debe investigar la forma en la que le dio origen, bien que a nivel genético se modificó el gen para dar un nuevo producto o fue a nivel de la proteína, además de los cambios postraduccionales como la glicosilación (Curtis 2001), esto siguiendo las bases que marca la teoría de “Evo Devo” (Hoekstra y Coyne. 2007) es posible que proteínas diseñadas para una función en particular (dependiendo de las condiciones a las cuales está sometido el individuo), pudieran servir como base y desarrollar otras funciones o mejorarlas, dependiendo del estímulo o presión del ecosistema que haya sufrido el individuo, y que es posible que marcadores como el CD25, receptor característico de células de la inmunidad adaptativa, especialmente importantes en la respuesta inmunitaria en humanos, a tal modo que incluso en el complejo de reconocimiento de la citocina con su receptor (IL-2-IL-2R), es endocitado y degradado, exceptuando a la subunidad α , la cual es reciclada para reutilizarse en membrana (Hérmar et al 1995; Yu and Malek 2001), esto nos indica la dificultad que involucra producirla o la eficiencia con la que actúa y nos permite inferir que no es energéticamente benéfico para las células linfocíticas el sintetizar proteínas, realizando un reciclaje, es posible que en crustáceos exista una proteína que presente una similitud estructural con el CD25 y esta tenga una función en el reconocimiento de moléculas endógenas o exógenas, también podría funcionar en la activación de los hemocitos, por ello su localización en los gránulos, esta preformación permite a los hemocitos actuar casi inmediatamente a un estímulo, al mover el contenido granular hacia donde es requerido y desarrollar algún tipo de función. Es necesario tener a los hemocitos en cultivos primarios prolongados y determinar su reacción al estimularlos con diferentes moléculas que se relacionen o activadores

policlonales, como los ésteres de forbol, fitohemaglutininas e interleucina 2 y estudiar los efectos que provoquen, como la proliferación, y determinar su localización, expresión o sus efectos en los mecanismos de defensa.

VI CONCLUSIONES:

Se determinó que los cultivos de células de *Cherax quadricarinatus* en medio RPMI permite a los hemocitos presentar una morfología característica y permite su adhesión preservándolas viables hasta por 60 minutos.

Se purificó el anticuerpo monoclonal dirigido contra la subunidad alfa receptor de interleucina 2 (IL-2R α o CD25) a partir de la línea celular PC61.

Se identificaron proteínas con epitopos compartidos con CD25 en hemocitos de langosta, de 30 kDa, presentes en la población de hemocitos tipo granular, la proteína de posiblemente funcione en con los mecanismos de defensa de los hemocitos, como molécula de reconocimiento contra agentes patógenos.

VII PERSPECTIVAS:

La localización de las proteínas relacionadas con IL-2R α no permite identificar la función de este marcador en los hemocitos, estudiar el efecto mostrado por la estimulación, nos ayudará a entender el mecanismo en el que está implicado, su relación con los mecanismos de activación, además identificar factores presentes en la hemolinfa, como moléculas parecidas a la IL-2 (y su función en la activación del receptor), factores que regulen la expresión de la proteínas y los mecanismos efectores que presenten.

VIII BIBLIOGRAFIA

- (1) Dra. Ma. Concepción Agundis Mata, profesor titular C tiempo completo, laboratorio 6, departamento de bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
- Abbas K. A., Linchtman H. A., Pillai S. 2012. Immunology cellular and molecular 7 Ed, Editorial elsevier. Philadelphia, USA. pp 2-7.
- Agundis C, Pereyra A, Zenteno R, Brassar C, Sierra C, Vazquez L and Zenteno E. 2000. Quantification of lectin in freshwater praw (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA. CBP 127: 165-172.
- Akiko S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell 124, 783-801.
- Ariki S, Koori K, Osaki T, Motoyama K, Inamori K, Kawabata S. 2004. A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 953–958.
- Aspán A, Söderhäll K. 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect Biochem. 21: 363–373.
- Bachere E, Destoumieux D, Bulet P, 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with effectors of innate immunity. Aquaculture 191: 71-88.
- Bauchau AG, Ratcliffe NA, Rowley AF, eds. 1981. Invertebrate Blood Cells. London and New York: Academic, 55: 385-420.
- Barcia R, Cao A, Arbeteta J, Ramos-Martinez, J. 1999. The IL-2 Receptor in Hemocytes of the Sea Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. IUBMB Life, 48: 419–423.
- Barcia R, Ramos-Martínez J. 2008. Effects of interleukin-2 on nitric oxide production in molluscan. Innate immunity 5: 43-49.
- Cao A, Ramos-Martínez J, Barcia R. 2004. *In vitro* effects of LPS, IL-2, PDGF and CRF on haemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Fish Shellfish Immunol. 16: 215–225.

Cao A, Mercado L, Ramos-Martinez JI, Barcia R. 2003. Primary cultures of hemocytes from *Mytilus galloprovincialis* Lmk: expression of IL-2R α subunit. *Aquaculture* 216: 1-8.

Cerenius L, Söderhäll K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev.* 198: 72–82.

Cheng W, Liu CH, Tsai CH, Chen JC. 2005. Molecular cloning and characterization of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 18: 297–310.

Destoumieux D, Muñoz P, Bulet P, Bachere E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci.* 57: 1260–1271.

Destoumieux D, Muñoz M, Cosseau C, Rodriguez J, Bulet P, Comps M, Bachere E. . 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *J Cell Sci.* 113: 461–469.

Destoumieux D, Bulet P, Strub JM, Van Dorsselaer A, Bachere E. 1999. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *Eur J Biochem.* 266: 335–346.

Durliat M. 1985. Clotting processes in crustacean decapoda. *Biol Rev.* 60: 473–498.

Enghild, JJ, Thøgersen IB, Salvesen G, Fey GH, Figler NL, Gonias SL, Pizzo SV. 1990. α 2-macroglobulin from *Limulus polyphemus* exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system. *Biochemistry* 29: 10070-10080.

Flandre O, 1971. The culture of molluscan cell, in: *Invertebrate tissue culture* 1 Acad. Press New York, pp 361-383.

Hoekstra H.E and Coyne J.A. 2005. The locus of evolution: Evo Devo and the genetics of adaptation. *Evolution* 61-5: 995–1016

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313–1318.

Hall M, Söderhäll K, Sottrup-Jensen L. 1989. Amino acid sequence around the thiolester of α 2-macroglobulin from plasma of the crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. FEBS Lett. 254: 111-114.

Hémar A, Subtil A, Lieb M, Morelon E, Hellio R, Dautry-Varsat A. 1995. Endocytosis of interleukin 2 receptors in human T lymphocytes: distinct intracellular localization and fate of the receptor α , β , and γ chains. J. Cell Biol. 129: 55–64.

Iwanaga S, Lee BL. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochem Mol Biol. 38: 128–150.

Du J, Yang H, Zhang D, Wang J, Guo H, Peng B, Guo Y, Ding J. 2010. Structural Basis for the Blockage of IL-2 Signaling by Therapeutic Antibody Basiliximab. J Immunol. 184:1361-1368.

Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture 191: 45-52.

Kawabata SI, Mutua T, Iwanaga S, 1996. The clotting cascade and defense molecules found in the hemolymph of the horseshoe crab. New direction. In: Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta GR., (eds) Invertebrate Immunology. Fair Haven, CT: SOS; 255–283.

Kindt JT, Goldsby A R, Osborne AB. 2007. Immunologia de Kuby. 6 Ed. Editorial McGraw Hill. D.f, México

Koizumi N, Imamura M, Kadotani T, Yaoi K, Iwahana H, Sato R. 1999. The lipopolysaccharide-binding protein participating in hemocyte nodule formation in the silk worm *Bombyx mori* is a novel member of the C-type lectin superfamily with two different tandem carbohydrate- recognition domains. FEBS Lett. 443: 139–143.

Lavine MD, Strand MR. 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol. 32: 1295-1309.

Lebel J-H, Girard W, Favrel P, Boucaud-Camou E. 1996. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gasteropod mollusk *Haliotis tuberculata*. Biol Cell. 86: 67– 72.

Lee SY, Wang R, Söderhäll KA. 2000. Lipopolysaccharide- and b-1,3-glucan binding protein from hemocytes of freshwater crayfish *Pacifastacus*

- leniusculus*: purification, characterization, and cDNA cloning. J Biol Chem. 275: 1337–1343.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J, Hoffman J. 2003. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell 114: 973-983.
- Lin X, Söderhäll K and Söderhäll I. 2011. Invertebrate Hematopoiesis: An Astakine-Dependent Novel Hematopoietic Factor. J Immunol. 186:2073-2079
- Li-Shi Y, Zhi-Xin Y, Ji-Xiang L, Xian-De H, Chang-Jun G, Shao-Ping W, Su-Ming C, Xiao-Qiang Y, Jian-Guo H. 2007. A Toll receptor in shrimp. Mol immunol. 44: 1999-2008.
- Marques MRF, Barracco MA. 2000. Lectins as non-self recognition factors, in crustaceans. Aquaculture 191: 23–44.
- McKay D, Jenkin CR. 1970. Immunity in the invertebrates. Aust J Exp Biol Med Sci. 48: 139–150.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr, 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell 91: 295–307.
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F, Salzet M, Roch P. 2000a. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. J Biol Chem. 275: 12954-12962.
- Mori K, Stewart JE. 2006. Immunogen-dependent quantitative and qualitative differences in phagocytic responses of the circulating hemocytes of the lobster *Homarus americanus*. Dis Aquat Organ. 69: 197–203.
- Mudlarz L, Jones LE, Harvell CD. 2006. Innate immunity, environmental drivers, and disease ecology of marine and fresh water invertebrates. Annu Rev Ecol Evol Syst, 37: 251–288.
- Novas A, Cao A, Barcia R, Ramos-Martinez JI. 2004. Nitric oxide and hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. IJBCB. 36: 390-394.
- Novas A, Barcia R, Ramos-Martinez JI. 2007. Nitric oxide production by haemocytes from *Mytilus galloprovincialis* show seasonal variations. Fish & Shellfish immunol 23 886-891.
- Padi A, Verghese B. 2008. Detecting molecular adaptation at individual codons in the pattern recognition protein, lipopolysaccharide and β -1,3-binding protein of decapods. Fish Shellfish immunol. 24: 638-648.

- Paul WE. 2003. *Fundamental Immunology*. 5 Ed. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA. pp 550-551.
- Peebles J, 1977. A rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 12: 173-180.
- Pereyra A, Zenteno R, Vázquez L, Martínez-Carro S, Rodríguez A, Mendoza , Zenteno E, Agundis C. 2004. Characterization of lectin aggregates in the hemolymph of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *BBA* 1637: 122-130.
- Power A, Mulcahy MF, Sheehan D. 1998. Mollusc a cell culture. *Trends Comp Physiol*. 4: 165–176.
- Raftos DA, Stillman DL, Cooper EL. 1991. Interleukin-2 phytohaemagglutinin stimulated the proliferation if tunicate cells. *Immunol cell biol*. 69: 225-234.
- Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Int Rev Cytol*. 97: 183–350.
- Rather S, Vinson SB. 1983. Phagocytosis and encapsulation: cellular immunity in arthropoda. *Am Zool*. 23: 185–194.
- Relf JM, Chisholm JR, Kemp GD, Smith VJ. 1999. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5 kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Eur J Biochem*. 264: 350–357.
- Mathias R, Wang X, Boulanger MJ, Goriatcheva N, Garcia KC. 2005. The Structure of Interleukin-2 Complexed with Its Alpha Receptor. *Science* 308: 1477-1480
- Roitt I, Brostoff J, Male D. 2003. *Inmunologia* 5a Ed. Editorial Mosby,. London UK. pp 205-206
- Rojas Espinoza Ó. 2006. *Inmunología (de memoria)* 3 Ed; Editorial Panamericana, D.f. México. pp. 27,57.
- Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D. 2002. Cutting edge: the Toll pathway is required for resistance to Gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J immunol*. 168: 1542-1546.
- Sahoo P, Pillai BR, Mohanty J, Kumari J, Mohanty S, Mishra BK. 2007. Differential affinity of the natural haemagglutinin of *Macrobrachium rosenbergii*

towards vertebrate erythrocytes: effect of sex, size and moult stage on haemagglutination titre. *Indian J Exp Biol.* 45: 1–5.

Soria F, Sierra C, Bouquelet S, Brassart C, Agundis C, Zenteno E, Vázquez L. 2006. The effect of sugars and free amino acids from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemolymph on lectin activity and on oxidative burst. *Comp Biochem Physiol C.* 142: 212–219.

Söderhäll K. 2010. Springer Invertebrate immunity. 2nd Ed. Science+Business Media, LLC Landes Bioscience. New York, USA. pp 239-253.

Söderhäll K, Cerenius L. 1998. Role of the prophenoloxidase- activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol.* 10: 23-28.

Söderhäll K, Iwanaga S, Vasta GR., (eds) Invertebrate Immunology. Fair Haven, CT: SOS;NJ, USA. pp 255–283.

Söderhäll K, Smith VJ. 1983. Separation of hemocyte population of *Carcinus maenas* and other marine decapods and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol.* 7: 229-239.

Söderhäll K, Vey A, Rented M. 1984. Haemocytes lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Dev Comp Immunol.* 8: 23–29.

Sricharoen S, Kim JJ, Tunkijanukij S, Söderhäll I. 2005. Exocytosis and proteomic analysis of the vesicle content of granular hemocytes from a crayfish. *Dev. Comp. immunol* Vol: 1017-1031.

Sritunyalucksana K, Söderhäll K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191: 53–69.

Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, Nakamura M, Takeshita T. 1996. The interleukin-2 receptor chain: It's Role in the Multiple Cytokine Receptor Complexes and T Cell Development in XSCID. *Annu Rev Immunol.* 14: 179–205.

Tang IY, Meier-Kriesche HU Kaplan B. 2007. Immunosuppressive strategies to improve outcomes of kidney transplantation. *Semin Nephrol.* 27: 377–392.

Tyson CJ, Jenkin C. 1974. Phagocytosis of bacteria in vitro by haemocytes from the crayfish (*Parachaeraps bicaritus*). *Aust J Exp Biol Med Sci.* 52: 341–348.

- Vargas-Albores F, Yepiz-Plascencia G. 2000. Beta glucan binding protein (BGBP) and its role in immune response. *Aquaculture* 191: 13–21.
- Vasta GR, Ahmed H, Tasumi S, Odom E, Saito K. 2007. Biological roles of lectins in innate immunity: molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition. *Adv Exp Med Biol.* 598: 389–406.
- Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G, Agundis C, Pereyra A, Zenteno E. 2009 Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity* 15: 179-188.
- Vazquez L, Jaramillo L, Lascurain R, Cooper EL, Rosas P, Zenteno E. 1996. Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp Biochem Physiol B.* 113: 355–359.
- Vazquez L, Lanz H, Montañó LF, Vasquez L, Zenteno E. 1994. Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii* *Lectins Biol. Biochem. Clin. Biochem.* Vol 10. E. Van Driessche, S Beeckmans, T.C. Bog-Hansen, eds. Denmark pp 261-265.. 10: 261–265.
- Vazquez L, Perez A., Millan A, Agundis C, Martin G, Cooper E.L., Lascurain R, Zenteno E. 1997. Morphological analysis of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J Morphol.* 234: 147–153.
- Waldmann TA. 2007. Daclizumab (anti-Tac, Zenapax) in the treatment of leukemia/lymphoma. *Oncogene* 26: 3699–3703.
- Waldmann TA. 1989. The multi-subunit interleukin-2 receptor. *Annu Rev Biochem.* 58: 875–911.
- Waldmann TA. 2003. The meandering 45-year odyssey of a clinical immunologist. *Annu Rev Immunol.* 21: 1–27.
- Waldmann TA. 1986. The structure, function, and expression of interleukin-2 receptors on normal and malignant lymphocytes. *Science* 232: 727–732.
- Wickins JF, Beard TW. 1974. Observations on the breeding and growth of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in the laboratory. *Aquaculture* 3: 169-174.
- Yu A, Malek TR. 2001. The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2. *J Biol Chem.* 276: 381–385.
- Zeev Pancer and Max D. Cooper. *The Evolution of Adaptive Immunity.* *Annu. Rev. Immunol.* 2006. 24:497–518

Zenteno R, Vazquez L, Sierra C et al. 2000. Chemical characterization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by Maldi-Tof. Comp Biochem Physiol; 127: 243–250.