



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR DE LA
LANGOSTA CHERAX QUADRICARINATUS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VIVANCO ROJAS OSCAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2015



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

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGIA EXPERIMENTAL

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR DE LA LANGOSTA CHERAX QUADRICARINATUS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VIVANCO ROJAS OSCAR

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM.

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2015



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de septiembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **VIVANCO ROJAS OSCAR** con número de cuenta **402085416**, con la tesis titulada "**MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA INMUNIDAD CELULAR DE LA LANGOSTA *Cherax quadricarinatus***", realizada bajo la dirección del **DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO**:

Presidente: DR. ARMANDO PÉREZ TORRES
Vocal: DR. CUAUHEMOC JUAN HUMBERTO LANZ MENDOZA
Secretario: DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Suplente: DRA. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND
Suplente: DR. RICARDO LASCURAIN LEDESMA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de noviembre de 2015

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por aceptarme, a la beca Conacyt numero 376077. Este trabajo fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN214315, Conacyt CB-0129932 y PAPIIT 204315. También agradecer al comité tutor: Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dr. Roberto Arreguin Espinosa de los Monteros y al Dr. Ricardo Lascurain Ledesma.

Este trabajo se realizo bajo la dirección de la Dra. Concepción Agundis Mata, el Dr. Edgar Zenteno Galindo y el Dr. Mohamed Ali Pereyra Morales, en el laboratorio 6, departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

Quiero agradecer en primera lugar a la Fundación Agundis por todo el apoyo académico y familiar en la realización de este proyecto, a la fundadora, presidenta, directora, personaje honorario y administradora. Por todo el apoyo brindado personal y académica; Gracias Dra. Concepción Agundis.

Al Dr. Zenteno por ayudarme a terminar este trabajo por el apoyo antes y después de la maestría.

A mis padres por entender lo que me gusta y por el apoyo en mi trabajo.

A mis hermanos y a la cuadrilla de sobrinos que siempre me regalan una sonrisa en cada encuentro, en especial a mi sobrina Vico por enseñarme que siempre se puede abrazar un poco más.

A mis compañeros de laboratorio que están y que estuvieron, Jose Luis (Gordo), Montserrat (Möntse), Tania (Polenski), Ali, Lileny, Erika, gracias chicos por todas las platicas y risas a diario.

A todas las langostas que participaron en este trabajo, son los héroes anónimos de la investigación.

INDICE:

1. RESUMEN	2
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCION	4
i. Sistema Inmune: Innata y Adaptativa	4
ii. Inmunidad en invertebrados	5
iii. Hemocitos en la respuesta celular	6
iv. Fagocitosis	8
v. Encapsulación	9
vi. Proteínas de la coagulación y péptidos antimicrobianos (AMP)	10
vii. Lectinas	12
viii. Sistema proPO	14
ix. Receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs)	15
x. Moléculas de señalización	17
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. HIPOTESIS	20
6. OBJETIVOS	20
7. METODOLOGIA	21
8. RESULTADOS	28
9. DISCUSION	39
10. CONCLUSIONES	50
11. PERSPECTIVAS	51
12. LITERATURA CITADA	52

RESUMEN

En la respuesta inmune de crustáceos, se han identificado en la hemolinfa factores que poseen capacidad de reconocimiento y alta especificidad a antígenos de patógenos. Se desconocen los mecanismos reguladores involucrados en la respuesta inmune celular (hemocitos) de estos organismos, pero se sabe que desempeñan funciones inmunes como la fagocitosis, activación de la fenol oxidasa, coagulación, liberación de péptidos microbianos y se ha identificado la presencia de algunas moléculas de señalización como citocinas. En este trabajo se propone identificar la presencia de proteínas homólogas a CD25; receptor para la IL-2 (IL-2R) que en vertebrados tiene como efecto final la activación, proliferación y síntesis de otras citocinas. Caracterizar los mecanismos de activación por citocinas en la generación de especies reactivas de oxígeno de la langosta *Cherax quadricarinatus* y dilucidar la participación de proteínas similares a CD25 en la regulación de la respuesta celular. En la hemolinfa se identificaron 3 poblaciones con tinción de hematoxilina-eosina, enseguida, partiendo de lisados celulares, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE al 10%), posteriormente se realizó un inmunoblot que se reveló con el anticuerpo monoclonal murino de la clona PC61 específico a IL-2R (CD25; antiCD25-Px). Para determinar su localización en los hemocitos se realizó una inmunocitoquímica, para lo cual se incubaron con anticuerpo antiCD25-FITC y se observaron en microscopio de fluorescencia. Para caracterizar las proteínas se realizó una separación por electroforesis en 2 dimensiones y después un inmunoblot incubando con anti-CD25-Px. Las proteínas reconocidas se secuenciaron por espectrometría de masas (MS/ESI). Para determinar la participación de CD25 en la producción de especies reactivas de oxígeno, se determinó el estallido respiratorio en hemocitos estimulando con PMA, IL-2, DPI y antiCD25, para identificar la presencia y/o movimiento de CD25 en la célula se realizó una inmunocitoquímica de hemocitos en las mismas condiciones de estimulación revelando con antiCD25-FITC. A partir de un lisado celular de hemocitos estimulados en las condiciones antes descritas, se realizó una electroforesis SDS-PAGE y se determinó por inmunoblot con antiCD25-Px. La electroforesis mostró múltiples bandas con pesos moleculares entre 10 y 200 kDa, mostrando mayor concentración entre 31 y 97 kDa. La inmunoelectrotransferencia reveló una banda de 23 kDa, mientras que la inmunocitoquímica presentó marcaje positivo en células de tipo granular, donde la marca se localiza en gránulos citoplasmáticos. El inmunoblot de las muestras separadas por electroforesis en 2D, reveló 2 puntos de 21 y 23 kDa con pI en el rango de 8.6 a 8.9; la espectrometría de masas determinó que la subunidad de 21 kDa presenta similitud con el antagonista de la interleucina 1A (IL-1RA). La estimulación con IL-2 no genera especies reactivas de oxígeno y no modifica la presencia de las proteínas similares a CD25. Mientras que la estimulación con PMA, aumenta la intensidad de las proteínas similares a CD25, también modifica la morfología, disminuyendo la presencia de filopodios, mientras que inhibiendo con DPI la marca en gránulos citoplasmáticos de CD25 y la morfología se modifica creando filopodios de manera lateral. Al revelar por inmunoblot los lisados celulares estimulados con PMA revelan un aumento en el reconocimiento de la proteína de 21 kDa y el reconocimiento de una nueva banda, de 54 kDa, éste reconocimiento se pierde cuando se inhiben las especies reactivas de oxígeno con DPI. Nuestros resultados sugieren la presencia de proteínas similares a CD25, que se localizan en gránulos citoplasmáticos en 2 tipos celulares y que podrían participar en la regulación de los mecanismos de defensa como el estallido respiratorio.

ABSTRACT

In the immune response of crustaceans, they have been identified in the hemolymph factors possessing recognition capability and high specificity to antigens of pathogens. The regulatory mechanisms involved in the cellular immune response (hemocytes) of these organisms are unknown, but are known to play immune functions such as phagocytosis, phenol oxidase activation, coagulation, release of microbial peptides and identified the presence of certain molecules signaling as cytokines. This paper aims to identify the presence of proteins homologous to CD25; the receptor for IL-2 (IL-2R) in vertebrates has the ultimate effect of activation, proliferation and synthesis of other cytokines. Characterize the mechanisms of activation by cytokines in the generation of reactive oxygen species lobster *Cherax quadricarinatus* and elucidate the involvement of CD25-like proteins in regulating the cellular response. From hemolymph three populations with hematoxylin-eosin were identified immediately, starting from cell lysates electrophoresed (SDS-PAGE 10%), then an immunoblot revealed that the murine monoclonal antibody of the clone was made specific to IL-2R (antiCD25 CD25-Px) PC61. To determine its location in hemocyte immunocytochemistry was performed, for which they were incubated with antiCD25-FITC antibody and observed under fluorescence microscope. To characterize the proteins separation by two-dimensional electrophoresis was performed and then W with antiCD25-Px. The proteins identified were sequenced by mass spectrometry (MS/ESI). To determine the involvement of CD25 in the production of reactive oxygen species, respiratory burst was determined in hemocytes stimulating with PMA, IL-2 DPI and antiCD25, to identify the presence and/or movement of CD25 on the cell was performed immunocytochemistry hemocytes under the same conditions with stimulation revealing antiCD25-FITC. From a hemocyte lysate stimulated in the conditions described above, SDS-PAGE electrophoresis was performed and it was determined by Western-blot with antiCD25-Px. Electrophoresis showed multiple bands with molecular weights between 10 and 200 kDa, showing higher concentration between 31 and 97 kDa. Western-blot revealed a band of 23 kDa, while immunocytochemistry showed positive staining in granular cells, where the mark is located in cytoplasmic granules. The Western-blot of samples separated by 2D electrophoresis revealed two points 21 and 23 kDa with pI in the range of 8.6 to 8.9; mass spectrometry determined that the 21 kDa subunit exhibits similarity to the 1A antagonist (IL-1RA) interleukin. Stimulation with IL-2 does not generate reactive oxygen species and does not alter the presence of similar proteins to CD25. While PMA stimulation, increases the intensity of the CD25-like proteins, also modifies the morphology, reducing the presence of filopodia while creating laterally filopodia modifies inhibiting the mark DPI in cytoplasmic granules of CD25 and morphology. By revealing cell lysates by immunoblot stimulated with PMA show an increase in the recognition of the protein of 21 kDa and recognition of a new band of 54 kDa, this recognition is lost when reactive oxygen species with DPI are inhibited. Our results suggest the presence of similar proteins to CD25, which are located in cytoplasmic granules in 2 cell types and that could participate in the regulation of defense mechanisms such as the respiratory burst.

INTRODUCCION:

Sistema Inmune: Innata y Adaptativa:

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 contacto con el agente infectante, con la diferencia de que la inmunidad adaptativa tiene memoria inmunológica respondiendo de manera específica y eficiente ante un segundo reto, mientras que la innata responde de manera específica pero con exposiciones subsecuentes no cambia su especificidad (Rojas, 2006). Estos dos tipos de inmunidad hacen posible la eliminación de los diferentes agentes patógenos con diferentes mecanismos. La inmunidad adaptativa humoral de los vertebrados está mediada por anticuerpos producidos por linfocitos B y células plasmáticas. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra patógenos extracelulares y sus toxinas (Abbas, 2012).

El sistema innato actúa contra cualquier agente nocivo, es capaz de reconocer específicamente un número limitado de estructuras moleculares que comparten los microorganismos; para ello, utiliza una cantidad igualmente limitada de receptores, codificados por las células germinales y que están presentes en la superficie, vesículas y citoplasma de varios tipos celulares entre los que se incluyen: macrófagos, neutrófilos, células cebadas, epiteliales, endoteliales, dendríticas, natural *killer* (Vivier and Malissen, 2005). Estos receptores se expresan para detectar e interactuar con estructuras o patrones moleculares de microorganismos (PAMPs).

El sistema inmune innato es capaz de reconocer, además de los productos bacterianos, a células del huésped lesionadas o estresadas que exhiben moléculas poco expresadas en células sanas (DAMPs) p. ej. proteínas de choque térmico, moléculas similares a MHC 1 y fosfolípidos de membrana alterados. La respuesta inmune natural o innata, está determinada genéticamente, es inmediata, espontánea, no se incrementa con exposiciones repetidas al mismo agresor e influye en la dirección que seguirá la respuesta específica o facultativa. Participan en ella como barreras, elementos anatómicos, bioquímicos, fisiológicos y biológicos. Trained immunity

El estudio de la inmunología comparada (Du Pasquier, 2001) demuestra 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 se ha descrito de manera precisa (Pancer y Cooper, 2006). El estudio de los mecanismos de defensa en los invertebrados constituye una importante fuente de información sobre los orígenes del sistema inmunitario innato (Hoffman *et al.*, 1999).

Los invertebrados representan el 97% de especies animales a nivel mundial, lo que indica que parte de su éxito en la colonización es su adaptación a los ambientes y la capacidad de defenderse contra distintos patógenos. El análisis de distintas especies de invertebrados en un proceso infeccioso se identifican una serie de eventos de reconocimiento y eliminación de los patógenos, esto requiere de la participación de grupos celulares y factores humorales generados contra antígenos específicos como los demostrados en vertebrados. Estos procesos sugieren que los mecanismos de defensa de los invertebrados pueden considerarse como precursores del sistema inmune innato de vertebrados (Iwanaga *et al.*, 2005).

Inmunidad en invertebrados.

Los crustáceos poseen un sistema circulatorio abierto mediante el cual se distribuyen nutrientes, oxígeno, hormonas, moléculas reactivas, células fagocíticas y enzimas que participan en la respuesta inmune. El estudio de la inmunidad en invertebrados se ha enfocado fundamentalmente en esclarecer los mecanismos y rutas bioquímicas activadas durante una infección, e identificar los elementos celulares y/o factores humorales presentes en la hemolinfa involucrados en la destrucción de patógenos, en la regulación y en la reparación del daño (Vázquez *et al.*, 2009).

Los crustáceos carecen de un sistema inmune adaptativo. Aunque se han propuesto vacunas que pueden proteger a manera de inmunización, como la proteína VP28 que protege camarones del virus de la mancha blanca como una forma terapéutica potencialmente fácil contra la enfermedad de la mancha blanca en la acuicultura (Mu *et al.*, 2012). Además de tener desarrollado un sistema de defensa que responde contra antígenos de la superficie de patógeno. Estos mecanismos de defensa son constituyentes del sistema inmune innato; para el reconocimiento de los patógenos emplean receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de diferentes

microorganismos incluyendo Lipopolisacárido (LPS), péptidoglucanos (PGN), RNA de doble cadena y β -glucanos entre otros.(Ferrandon *et al.*, 2007).

Las barreras físicas son el primer obstáculo que detiene la introducción de los patógenos (Söderhäll, 1982). Cuando estas barreras se dañan, los microorganismos invaden el tejido, y se activan rutas proteolíticas, que permiten la disminución y/o eliminación de patógenos que invaden al organismo (Ratcliffe *et al.*, 1985), al atravesar esta primera barrera, los microorganismos se enfrentan a diversos mecanismos que los limitan lo que favorece la activación de distintas rutas como la cascada de la coagulación, que además evita la pérdida de la hemolinfa, estimula la producción de metabolitos oxidantes y, activando el sistema de la profenoloxidasa (proPO) (Kawabata *et al.*, 1990; Vargas-Albores *et al.*, 2000). Estos procesos permiten la activación de los demás mecanismos (Esquema 1) de defensa que incluyen la fagocitosis, la encapsulación, la formación de nódulos, la coagulación, la aglutinación y la actividad microbicida (Sritunyalucksana *et al.*, 2000).

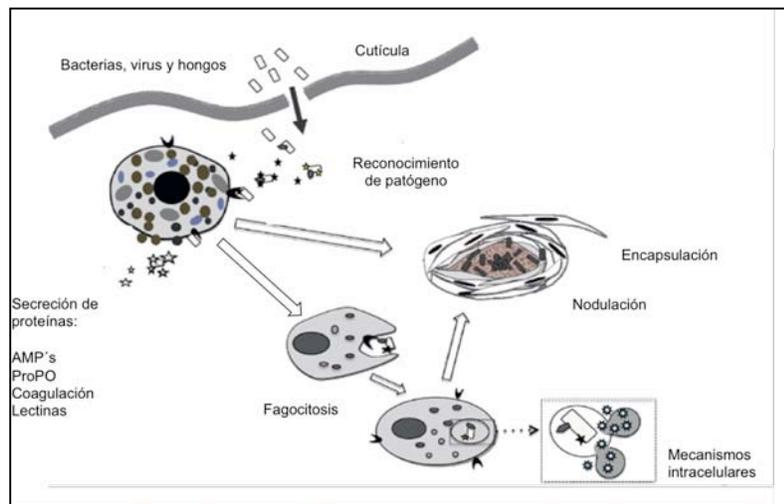


Figura 1.- Mecanismos de defensa en invertebrados. Modificado de Smith (2010). AMP's:Peptidos antimicrobianos ; ProPO: profenoloxidasa.

Los hemocitos en la respuesta celular

Se ha demostrado que los hemocitos o células sanguíneas están involucradas en los mecanismos de defensa, se clasifican en tres grupos, dependiendo de su morfología y contenido granular (Söderhäll, 2010). Morfológicamente, se consideran análogos a los leucocitos de los vertebrados, poseen en su interior gránulos con conteniendo proteínas de reconocimiento, de ataque, moléculas de adhesión y enzimas reguladoras. Las células

hialinas (H) son las más simples, no presentan gránulos, una vez activadas liberan factores que participan en la formación del coágulo y en procesos como la fagocitosis. Las células semigranulares (SG) poseen gránulos intracitoplasmáticos que al activarse liberan factores bactericidas y otras con función opsonizante como las lectinas. Las células granulocíticas (G), consideradas las más complejas del sistema de defensa, presentan múltiples gránulos intracitoplasmáticos que tras la activación celular, secretan moléculas reguladores que participan en la activación de otros mecanismos humorales como la proPO que actúa en el ataque a microorganismos.

La hematopoyesis es un proceso el cual permite la formación y desarrollo de las poblaciones celulares, este proceso está regulado estrechamente por factores liberados como las astacinas que se han propuesto como moléculas asociadas a procesos de diferenciación, desde el momento en que los hemocitos salen a la circulación. En algunos artrópodos como *D. melanogaster* los hemocitos maduros se forman en el mesodermo temprano de la cabeza embrionaria, en la etapa de larvas en un órgano especializado llamado glándula linfoide y en las moscas adultas no hay generación de nuevos hemocitos (Crozatier *et al.*, 2007); en contraste, el desarrollo hematopoyético del cangrejo *Pacifastacus leniusculus* (Chaga *et al.*, 1995, Lin *et al.*, 2009) es un proceso continuo que perdura a lo largo de la vida.

Los tejidos hematopoyéticos en los crustáceos (HPTs por su siglas en ingles) se ha descrito como un órgano definido (Johnson, 1980) compuesto de lóbulos envueltos por una cubierta delgada de tejido conectivo. En los lóbulos las células se encuentran en proliferación activa. El órgano linfoide (LO) de algunos langostinos se compone de lóbulos con túbulos plegados situadas junto al hepatopáncreas, el cual frecuentemente se confunde con un tejido hematopoyético, pero de acuerdo a estudios detallados (Van de Braak *et al.*, 2002) se demostró que LO juega un papel fundamental en la eliminación de bacterias y hemocitos senescentes en los crustáceos. La organización de HPTs de crustáceos se ha analizado detalladamente por microscopía electrónica en el cangrejo *Carcinus maenas*, el camarón *Sicyonia ingentis*, en la langosta *Homarus americanus* y en *P. leniusculus*. En estos estudios se ha adoptado la nomenclatura de Chaga *et al.* (1995) en la clasificación de células en el HPT, que identifica cinco categorías distintas en función de criterios morfológicos. Las células del tipo 1, tienen un núcleo grande rodeado por una pequeña cantidad de citoplasma (característico de células madre), mientras que las del tipo 2

también con un núcleo grande, contienen más gránulos citoplasmáticos. Los tipos 1 y 2 son las principales células que proliferan en la HPT, mientras que los otros tipos de células en el HPT han sido consideradas como precursores de hemocitos granulares de tipo 3 y 4 o como precursor de hemocitos semigranulares de tipo 5 (Wu *et al.*, 2008).

Fagocitosis

La fagocitosis es un proceso altamente conservado que ocurre en diferentes organismos, es considerada una respuesta primaria a partículas extrañas. La fagocitosis inicia por el reconocimiento y unión del patógeno o partícula, en algunos ejemplos se han identificado receptores para determinantes o patrones moleculares como las lectinas de membrana (Vazquez *et al.*, 1997) seguido de modificaciones en el citoesqueleto que favorece vacuolización y mediante transporte vesicular llega al fagosoma donde forman el fagolisosoma donde es destruido por procesos enzimáticos y oxidativos (Pearson *et al.*, 2003, Rämét *et al.*, 2002). En invertebrados, los hemocitos en circulación son los responsables de llevar a cabo la fagocitosis, aunque esta función no es exclusiva de un tipo celular. Se ha reportado que en lepidopteros las células granulares son las responsables, mientras que en *Drosophila*, cangrejos y langostinos las células hialinas llevan a cabo este proceso (Anggraeni and Ratcliffe, 1991; Elrod-Erickson *et al.*, 2000). Existen reportes en los que se comprobó que cangrejos de agua dulce *Parachaeraps bicarinatus* y *Cherax destructor* pueden reconocer particularmente bacterias Gram negativas como *Pseudomonas spp* y *Escherichia coli* (McKay y Jenkin, 1970) ,mientras que los hemocitos de *Homarus americanus* reconocen solamente a bacterias Gram negativas (Mori y Stewart, 2006).

El proceso de reconocimiento de un agente extraño puede darse por opsonización, mecanismo por el cual un organismo por medio de moléculas en membrana o solubles reconoce a los patógenos y facilita la fagocitosis. La participación de moléculas que se involucran en la opsonización han sido reportadas en distintos crustáceos como en el cangrejo de río *P. leniusculus* (Johansson *et al.*, 1999) en el que se encontró una molécula llamada peroxinectina, liberada por exocitosis con 2 funciones diferentes, una es la producción de sustancias antimicrobianas con actividad de peroxidasa; y otra asociada a procesos de adhesión celular e involucrada con la actividad fagocítica, desgranulación y encapsulación. Aunque es un proceso relacionado con los mecanismos de defensa, también

se le asocia con la remoción de células apoptóticas y el desarrollo de la homeostasis (Aderem y Underhill, 1999). Algunas proteínas solubles son capaces de unirse a determinantes antigénicos de las paredes de patógenos, posteriormente el complejo es reconocido por receptores presentes principalmente en hemocitos granulares, mediante los cuales activan mecanismos de defensa oxidativos dependientes de la NADPH oxidasa. El complejo de enzima unida a la membrana NADPH oxidasa se asocia después de la unión de la célula a material extraño y reduce el oxígeno molecular para generar superóxido, el cual es un radical libre que reacciona con otras moléculas para generar otras especies reactivas de oxígeno (Chanock *et al.*, 1994) que atacan al patógeno. La producción de superóxido *in vitro* se ha reportado en las células hialinas del cangrejo de orilla, *C. maenas* (Bell y Smith, 1993). En *Drosophila*, se han reportado niveles elevados de superóxido durante la encapsulación de parásitos (Nappi *et al.*, 1995) y en el caracol estanque *Lymnaea stagnalis*, se han reportado la participación de hemocitos para mediar la citotoxicidad a través de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (Adema *et al.*, 1994). En parásitos como helmintos, se ha sugerido que las enzimas anti-oxidantes son utilizados por el intruso para escapar de la defensa del huésped (Callahan *et al.*, 1988).

Encapsulación

La encapsulación es un mecanismo celular cuya función consiste en limitar o evitar que moléculas extrañas que no fueron eliminadas por mecanismos humorales. Este proceso restringe su movimiento y crecimiento en la hemolinfa. En los agregados celulares de hemocitos semigranulares de *Astacus leptodactylus*, se detectan factores de adhesión que rodean a las células extrañas o partículas mayores de 10µm de diámetro, como algunas esporas de hongos y los helmintos (Durliat, 1985). 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. Según 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 y de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y nitrógeno (RNI), péptidos antimicrobianos (Gillespie *et al.*,

1997; Nappi *et al.*, 2000) o bien por la acción tóxica de las quinonas, moléculas que están presentes en el contenido granular y cuya expresión aumenta durante una infección (Söderhäll *et al.*, 1998, Mitta *et al.*, 2000a).

Proteínas de la coagulación y péptidos antimicrobianos (AMP)

Las proteínas de la coagulación son esenciales para prevenir la pérdida de la hemolinfa en caso de lesiones; en algunos crustáceos estas proteínas también participan en el reconocimiento y la neutralización de moléculas o partículas no propias (Iwanaga y Lee, 2005). En varios crustáceos la coagulación está basada en la acción de transglutaminasas (TGasas), que realiza un entrecruzamiento de lisina y glutamina entre las proteínas de la coagulación que es dependiente de Ca^{2+} , es un proceso similar a la activación del Factor XIIIa de algunos vertebrados.

Las proteínas de la coagulación presentan funciones similares, pero no similitud estructural entre crustáceos, aunque se ha reportado un homólogo de la transglutaminasa de *T. tridentatus* en bibliotecas de cDNA de *L. vannamei* (Kawabata *et al.*, 1996). En *Limulus* los factores están en forma de zimógenos, coagulógeno, factor C, factor G, factor B. que pueden interactuar con moléculas extrañas presentes en bacterias, tal como el LPS que interactúa con el factor C y G (Iwanaga *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 2000) mientras que el factor G interactúa con el β -1,3 glucano de levaduras, ambos factores inician la formación de coagulina (forma insoluble del coagulógeno) (Tanaka e Iwanaga, 2003). En la Figura 2 se muestra el mecanismo de coagulación del cangrejo herradura, se ha descrito la cascada de coagulación en este organismo y también se le relaciona con otros mecanismos de defensa, más concretamente en la activación del sistema de la proPO (Nagai y Kawabata, 2000), en donde con ayuda de la hemocianina cuya función principal es como transportador de oxígeno al asociarse con el factor B, en su forma activa pueden en forma conjunta activar la fenol oxidasa, esta propiedad es exclusiva del factor B, ya que el factor C o G tanto en su forma de zimógeno como en su forma activa carecen de esta propiedad (Nagai *et al.*, 2001).

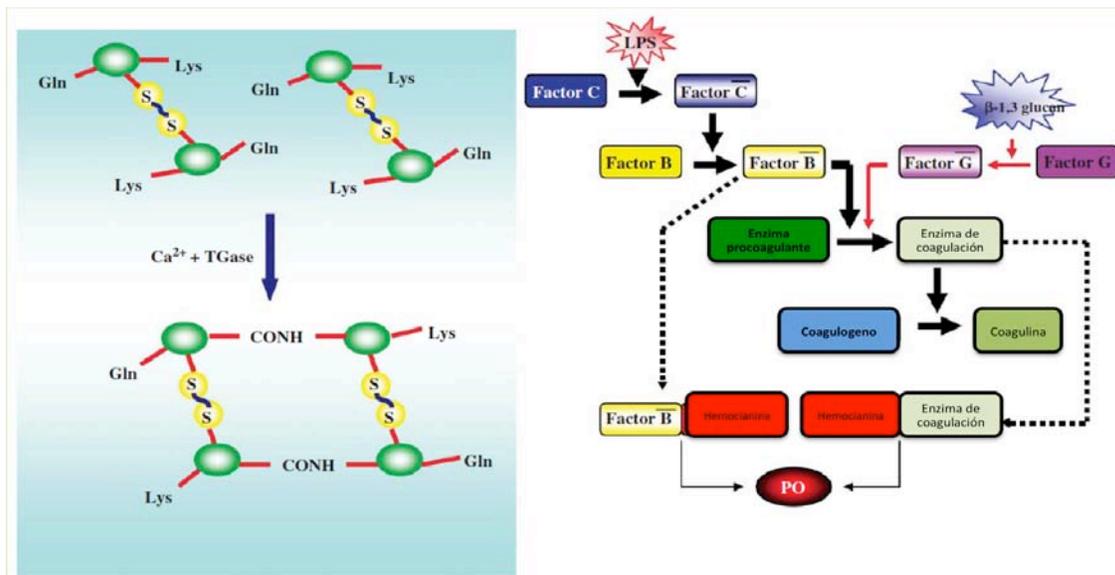


Figura 2.- Mecanismo de coagulación en camarón y cangrejo de río (A). Mecanismo de coagulación en cangrejo herradura(B). Modificado de Jiravanichpaisal *et al* (2006).

En los gránulos de hemocitos circulantes de crustáceos se han identificado proteínas con actividad microbicida presentes (Destoumiex *et al.*, 2004), se reportó una proteína de 11.5 kDa de *Carcinus maenas* activa contra bacterias Gram positivas (Relf *et al.*, 1999); existen además proteínas como las penaeidinas activas contra bacterias Gram positivas las penaeidinas 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 consta de 5 miembros y todas están relacionadas con actividad antimicrobiana a bacterias Gram positivas y hongos (Destoumiex *et al.*, 2000). Estas proteínas se almacenan en los gránulos de hemocitos de camarón y son liberadas en respuesta a infecciones bacterianas, sin embargo la transcripción de penaeidinas no parece ser inducida por infección microbiana y los niveles de mRNA aumentan ligeramente solo a las 48 h posteriores al reto bacteriano. 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).

Otro grupo de moléculas que funcionan como AMP son un grupo denominado crustinas, obtenidas por primera vez del cangrejo *Carcinus maenas*, denominada carcinina (Relf *et al.*, 1999), sin embargo se han encontrado secuencias similares a través de la expresión de

secuencias blanco (ETS) en camarón *L.vannamei* y *L. Setiferus* (Gross *et al.*, 2001) con lo cual el termino “crustina” se estableció para este tipo de péptidos antimicrobianos provenientes de crustáceos. Estos péptidos presentan una actividad variable, dependiendo del tipo de ensayo, *in vitro* presentan actividad contra bacterias Gram positivas, baja actividad contra Gram negativas (Supungul *et al.*, 2008), *in vivo* la respuesta entre Gram negativas y positivas es muy similar (Shockey *et al.*, 2009).

Lectinas

Una característica esencial en la inmunidad de cualquier ser vivo es el desarrollo de la habilidad de distinguir lo propio de lo extraño; en este contexto existen moléculas con función de reconocimiento a moléculas extrañas se ha descrito un grupo de proteínas denominadas lectinas (del latín *legere*, seleccionar). Las lectinas tienen la capacidad de reconocer específicamente oligosacáridos por medio de su dominio de reconocimiento a carbohidratos (CDR), de acuerdo a la variación de los distintos CDR y su estructura se han clasificado en 13 grupos en animales, las de tipo C, F, I, L, M, P, R, lectinas F-box, lectinas tipo quitinasa, ficolinas, calnexinas, galectinas e intelectinas (Dodd and Drickamer, 2001), Las funciones asociadas varían dependiendo de su localización, por ejemplo se ha sugerido que lectinas intracelulares podrían estar asociadas con el tráfico y direccionamiento de proteínas, mientras que las lectinas extracelulares son importantes para la señalización celular y reconocimientos de patógenos (Kilpatrick, 2002), ayudando a procesos como la fagocitosis en donde actúan como opsoninas (Marque *et al.*, 2000; Sahoo *et al.*, 2007), activación del estallido respiratorio (Sanchez *et al.*, 2014) y otros mecanismos de defensa (Figura 3), también se ha identificado la presencia de lectinas 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 identificó en las membranas de hemocitos circulantes, lo cual sugiere que la lectina es producida por los hemocitos, expresada en la superficie de su membrana, para realizar funciones de reconocimiento y liberada a la hemolinfa, donde además del reconocimiento, realiza aparentemente funciones de transporte de carbohidratos (Vázquez *et al.*, 1997; Zenteno *et al.*, 2000).

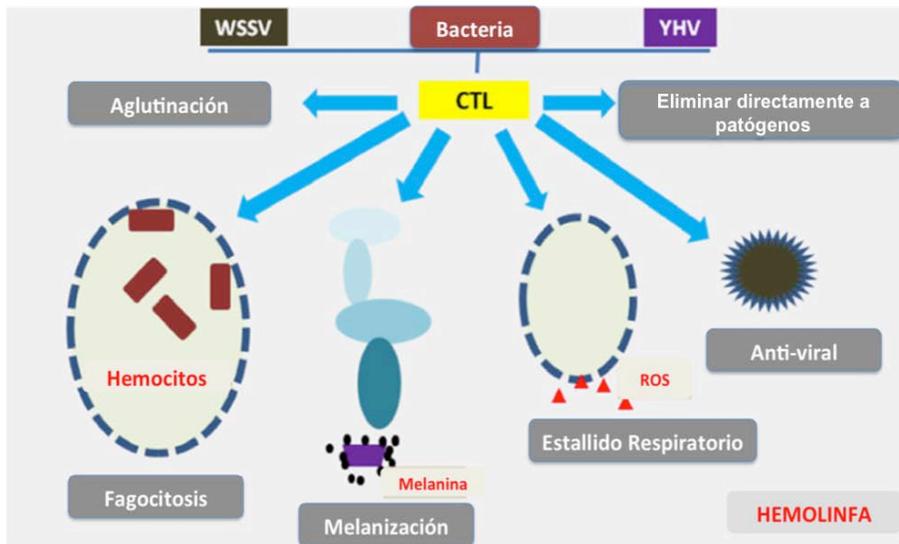


Figura 3.- Mecanismos de defensa asociados a la participación de las lectinas de tipo C. Tomado y modificado de Wang *et al* (2013)

La síntesis de lectina en los crustáceos es atribuida a diferentes órganos, 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 subunidades y poseen pesos moleculares distintos (Pereyra *et al.*, 2004).

Sin embargo se ha observado que en grupos de animales las lectinas preservan la capacidad de reconocer e interactuar con carbohidratos de estructura similar; por ejemplo las lectinas de crustáceos reconocen una serie carbohidratos 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 lectinas de crustáceos a lo largo de la evolución (Vasta *et al.*, 2007).

Sistema proPO

En invertebrados se ha identificado como mecanismo de defensa el denominado sistema de proPO, que presenta similitudes funcionales con el sistema del complemento de vertebrados. Su activación requiere una serie de reacciones enzimáticas concatenadas, este sistema enzimático puede ser activado por LPS o por β -glucanos, provocando la desgranulación celular (Söderhäll *et al.*, 1996). El precursor enzimático de la cascada es la profenoloxidasas (proPO) se produce en hemocitos de forma inactiva, después se libera al hemocele, para su activación y formación de fenoloxidasas (PO) requiere de Ca^{2+} . La fenoloxidasas cataliza la reacción donde la tirosina es convertida a dihidroxifenilalanina (DOPA) y la DOPA a DOPA-quinona un precursor de la melanina. Varios de los procesos de oxidación de moléculas como las catecolaminas, estos procesos son independientes de enzimas y son autocatalíticas, generando entre sus intermediarios especies reactivas, que interaccionan con oxígeno, formando especies reactivas de oxígeno sin necesidad de ser formado por enzimas como la NADPH oxidasa

La melanina es un pigmento negro-parduzco con diversas propiedades biológicas como la inhibición de la actividad enzimática de hongos y bacterias. Se ha propuesto la relación que existe entre la exocitosis del contenido granular de los hemocitos y la actividad de la proPO en el cangrejo *P. leniusculus* (Aspan *et al.*, 1997) por activación inducida por moléculas como LPS, amplifica la señal y resuelve la infección.

Algunas moléculas como la laminarina también inducen la 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).

En fechas recientes se aisló una proteína del cangrejo de agua dulce *Pacifastacus leniusculus* con un peso molecular de 76 KDa y pI de 7.2 que participa en los procesos de adhesión; demostrado en ensayos realizados sobre células adheridas que estas proteínas estimulan la encapsulación y la fagocitosis (Cerenius *et al.*, 2004). De igual manera la unión de estos factores induce la amplificación del sistema de la proPO, provocando la desgranulación de células pequeñas y grandes. Se han encontrado proteínas en invertebrados como la α 2-macroglobulina con estructura dimérica que contrasta con la

forma tetramérica presente en los mamíferos; estas proteínas conservan dominios internos tioéster conservados casi idénticos en organismos alejados filogenéticamente como los crustáceos y los seres humanos. Algunos de estos dominios se encuentran presentes en proteínas del complemento C3 y C4, estas proteínas en forma conjunta con otras proteínas presentes en la hemolinfa provocan lisis celular (Enghild *et al.*, 1990).

Receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)

La activación de los mecanismo de defensa se basan en el reconocimiento entre lo propio y lo extraño e involucra la participación de diversos elementos llamados receptores. Como las proteínas de reconocimiento a β -glucanos (BGBPs), componentes importantes del sistema inmune éstos se unen formando un complejo que es reconocido por un receptor de superficie de hemocitos, provocando desgranulación de la célula y activación del sistema de la proPO. Se ha demostrado por clonación que los receptores de peptidoglicanos (PGBPs) son codificados en el DNA de decápodos (Padi *et al.*, 2008) que la unión de los proteoglicanos (PGN) con sus receptores forman un complejo que activa la proPO, este reconocimiento desencadena uno de los distintos mecanismos de activación. Algunos PRRs 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, ésta proteína al reconocer a los β -1,3-glucanos incrementa la actividad de la fenoloxidasa (Lee *et al.*, 2000). Otros antígenos como los lipopolisacaridos (LPS) al ser reconocidos por proteínas presentes en los hemocitos (LGBPs) inducen la formación de nódulos. Recientemente se ha reportado que proteínas como LGBP y BGBP presentan una actividad de glucanasa, lo que sugiere que algunos de los receptores de glucanos pudieran haber tenido actividad de glucanasas, pero al perder paulatinamente la actividad enzimática mantienen solo la función de reconocimiento (Padi *et al.*, 2008). La clonación de cDNA de LGBP y BGBP de hemocitos de *L. vannamei*, presenta similitud con supuestos motivos de unión de integrinas y con motivos de unión de enlaces β 1-3 de polisacáridos lo cual podría tener algún tipo de homología de este tipo de receptores. Por otro lado, los autores demuestran que la expresión del gen de LGBP se incrementa en hemocitos tras el reto del camarón con *Vibrio alginolyticus* (Cheng *et al.*, 2005).

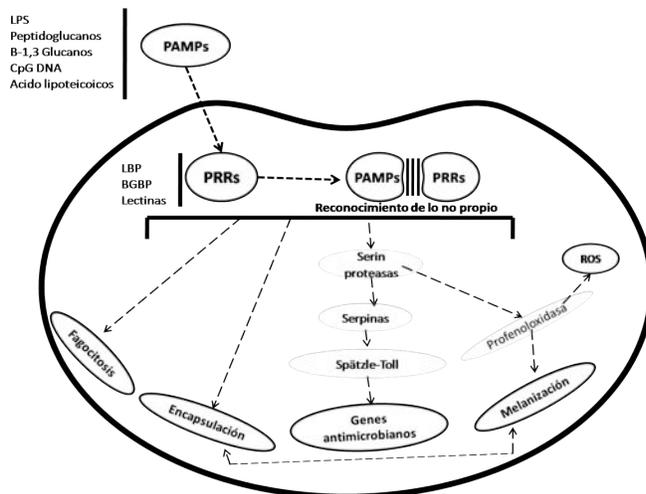


Figura 4.- Mecanismos efectores de los PRRs. (PAMPs, Patrones moleculares asociados a patógenos. PRRs, Patrones de reconocimiento de patógenos. LPS, Lipopolisacarido. ROS, Especies reactivas de oxígeno)

En mamíferos se han identificado familias de receptores tipo Toll (TLRs) que reconocen patrones moleculares de patógenos (PAMPs) con un amplio patrón de moléculas de reconocimiento. Los receptores tipo Toll, son proteínas transmembranales que comparten un elemento estructural, de motivos estructurales denominados LRR (del inglés *leucine-rich repeats*), seguidos de 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 TIR (de Toll/IL-1 receptor) por alusión a la similitud entre los dominios citoplasmáticos de los TLR y la región comparable del receptor de IL-1. 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 *Drosophila* la activación del receptor por el factor Spätzle que 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-1R), que se asocia 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).

Moléculas de señalización

Los distintos procesos celulares son una red de comunicación integrada que se ha conservado en todos los organismos multicelulares, aún en los más primitivos para preservar la forma estructura y funciones celulares. La organización de la función celular en los procesos de respuesta inmune se lleva a cabo por participación de mediadores químicos llamadas citocinas; estas son moléculas de bajo peso molecular que al interactuar con el receptor desencadena una señalización, que puede aumentar o disminuir procesos transcripcionales, alterando sus funciones efectoras incluso puede dar la señal de sobrevivencia o muerte celular. Muchas de estas moléculas se han descrito en invertebrados, aunque algunas citocinas no se han podido relacionar con las de vertebrados donde las funciones y mecanismos de acción están mejor caracterizadas. Algunos estudios han demostrado los efectos en la inmunidad de invertebrados después de la estimulación con citocinas recombinantes de vertebrados.

Se demostró que la estimulación con IL-2 e IFN- γ sobre celomocitos de gusano de tierra incrementan la fagocitosis (Fuller-Espie, 2010), efecto similar al demostrado por Malagoli *et al* (2008) quienes estimularon células de *Drosophila melanogaster* con IL-8. También se han medido efectos inhibitorios, como en los hemocitos de mejillón los cuales responden a la estimulación por TNF- α disminuyendo la fagocitosis (Betti *et al.*, 2006). Se ha descrito el factor inhibidor de migración (MIF) en el camarón *Litopenaeus vannamei* que actúa como citocina proinflamatoria y se expresa en células circulantes, corazón y hepatopáncreas (Zeng *et al.*, 2013). Es importante mencionar que aunque existen similitudes en las secuencia a nivel de DNA que sugieren la existencia de líneas de desarrollo de los animales primitivos a los vertebrados superiores pero no se han podido caracterizar u homologar completamente a nivel de proteoma, por lo que debemos estar abiertos para considerar el cambio de función de los productos génicos durante la evolución. Por lo tanto se puede sugerir que en la regulación de la comunicación celular se podría aplicar la participación de diferentes citocinas en diferentes etapas, incluso para las funciones inherentes a las propias citocinas correspondientes. En el molusco *Mytilus galloprovincialis* se identificaron 2 poblaciones celulares de las cuales las de tipo granular presentan marcaje a IL-2R (Barcia *et al.* 1999) , por otro lado Cao *et al.*, (2003) describen el efecto de la adición de IL-2 a un cultivo de hemocitos de *M. galloprovincialis*, con

aumento en la expresión de la subunidad α de IL-2R (CD25), incremento que se observa al emplear un antígeno como el LPS. El estímulo con LPS también ha sido asociado a mecanismos efectoros como la producción de óxido nítrico (NO) donde la IL-2 induce el aumento en la síntesis de NO al compararlo con el efecto mostrado por el LPS (Novas *et al.*, 2004), se ha propuesto la presencia de proteínas con semejanza a CD25 involucradas en desencadenar un mecanismo de defensa al reconocer un ligando. Se determinó que la interacción de la IL-2 con su receptor en hemocitos de tipo granular de mejillón (Barcia *et al.*, 2011), desencadena una serie de reacciones basadas en actividades de cinasas no descritas completamente aún. Además, en distintos estudios se reportó que los hemocitos de tipo hialino son negativos a CD25 aún después de estimular esta población (Barcia y Ramos-Martínez, 2008).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Los mecanismos de defensa en crustáceos se basan en la activación de sistemas tanto celulares como humorales presentes en la hemolinfa. Estas células involucradas en los mecanismos de defensa dependen del reconocimiento y diferenciación de lo propio y lo ajeno para desencadenar una serie de reacciones que lleven a cabo la activación y regulación de los mecanismo de defensa.

La importancia de la comunicación celular con base a la intervención de mediadores químicos y su interacción con un receptor llevan acabo una respuesta. Además la existencia de proteínas con homología estructural las cuales pueden o no desempeñar una actividad ya descrita. Permite suponer que los mecanismos de defensa de crustáceos se basan en la activación de sistemas celulares y humorales presentes en la hemolinfa. Estas células regulan sus funciones por mediadores químicos tras el reconocimiento. Sin embargo la posibilidad de que en crustáceos existan homólogos de citocinas y/o sus receptores, permite sugerir la posibilidad de que moléculas similares a citocinas y sus receptores en organismos como los crustáceos tengan participación en los mecanismos de defensa celulares.

HIPOTESIS:

En hemocitos de *Cherax quadricarinatus* existen receptores homólogos a CD25 y que la IL-2 activará el estallido respiratorio en los hemocitos.

OBJETIVO GENERAL

- Identificar mecanismos específicos de regulación tipo citocinas en hemocitos de *Cherax quadricarinatus* y determinar su función en la generación de radicales libres de oxígeno.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar la presencia de proteínas similares a CD25 en hemocitos.
- Identificar poblaciones de hemocitos positivas a CD25.
- Estudiar el efecto de anti-CD25 e IL-2 *in vitro* en la producción de radicales libres de oxígeno.
- Caracterizar las proteínas reconocidas con anti-CD25
- Determinar la expresión de las proteínas reconocidas por antiCD25 después de un estímulo con PMA.

METODOLOGIA:

Organismos

Se utilizaron langostas australianas de la especie *Cherax quadricarinatus*, machos adultos, entre 20-25 gramos, en estado de intermuda, provenientes de la unidad acuícola “El Higueron” Jojutla, Morelos, donde son cultivados en estanques rústicos, en el laboratorio se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura, oxigenación y salinidad durante 4 semanas .

Obtención de hemolinfa y células.

La obtención de hemocitos fue por extracción con jeringa de 3 mL calibre 21g x 32mm con anticoagulante para crustáceos (Söderhäll y Smith, 1983) (glucosa 100 mM, NaCl 20 mM, citrato de sodio 30 mM) puncionando en el seno pericardial) en relación 1:2, 1 mL de anticoagulante por 1mL de la hemolinfa conteniendo los hemocitos, se mantiene la mezcla a 4°C hasta su uso.

Tinción hematoxilina-eosina

Los hemocitos se centrifugaron a 300 x g por 8 min a 4°C, y se suspendieron en 500 µL de medio Grace (Invitrogen, United Kingdom), se tomaron 100 µL conteniendo 1×10^5 células de esta suspensión. Se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina delimitando los pozos con un marcador hidrofóbico. Se incubaron a 4°C por 15 min permitiendo la adhesión, se retira el exceso de suspensión y se fijan las células con paraformaldehído (PFA) al 2% en agitación constante a 4°C, 15 min, posteriormente, se lavaron los portaobjetos por 3 ocasiones con PBS pH 7.2. Enseguida se realizó una tinción de hematoxilina- eosina.

Electroforesis (SDS-PAGE)

Para separar el contenido proteico de los hemocitos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE); técnica que separa moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan en función de su carga eléctrica, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor

velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula, para esta se utilizaron hemocitos incubados por 30 min a 4°C con amortiguador de lisis (inhibidores de proteasas Roche®, PMSF y tritón X-100 al 1%) en agitación constante. La suspensión resultante se centrifugó a 12000 rpm 30 min, para eliminar residuos celulares. El sobrenadante se cuantificó proteínas con el kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA). Se tomó una muestra del sobrenadante conteniendo 60 µg de proteína, y se realizó la corrida electroforética siguiendo el método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% con SDS, en condiciones reductoras. Las muestras se diluyeron con amortiguador de muestra (Tris-HCl 75mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-MSH 2%, azul de bromofenol 0.001%, pH 8.8) en relación 1:2 y se sometieron a ebullición 15 min. Se utilizaron estándares de peso molecular conocido de rango amplio (BioRad, USA) y se tiñeron los geles con azul de Coomassie para revelar las proteínas presentes en el gel de poliacrilamida. 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%).

Inmunoelectrotransferencia

La Inmunoelectrotransferencia se realizó por el método descrito por Towbin *et al* (1979). Después de la electroforesis se incubó el gel y el papel de nitrocelulosa (NC) en amortiguador de transferencia (Tris base 25mM, glicina 192mM y metanol 20%, pH 8.3) durante 1.30 h. La transferencia se realizó 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 al papel de nitrocelulosa, se retiraron los pesos moleculares y tiñeron con amido negro al 0.01 %, en el resto de la membrana, se bloquearon los sitios reactivos libres con leche descremada al 5% en PBS durante 1.30 h a 37°C, posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01% (PBS-T) 5 veces, en agitación, 5 min por cada lavado. Se adicionó el anticuerpo AntiCD25 murino de la clona PC61 acoplado a peroxidasa (Anti-CD25-Px), en dilución 1:50 se incubó 90min a 37°C y se lavó la membrana con PBS-T cinco veces, 5 min cada lavado. Para visualizar el reconocimiento se utilizó solución de revelado Diaminobencidina (DAB) 6 mg, 50µL de H₂O₂ 30%, 12 mL de PBS) por 15 seg, se detuvo la reacción con agua destilada.

Inmunocitoquímica

Para poder determinar la localización de las proteínas reconocidas por anti-CD25 en las células se realizó una inmunocitoquímica. Al extraer los hemocitos se centrifugaron a 300 x g por 8 min a 4°C, y se suspendieron en 500 µL de medio Grace (Invitrogen, United Kingdom), se tomaron 100 µL conteniendo 1×10^5 células de esta suspensión. Se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina delimitando los pozos con un marcador hidrofóbico. Se incubaron a 4°C por 15 min permitiendo la adhesión, se retiró el exceso de suspensión y se fijaron las células con PFA al 2% en agitación constante a 4°C, 15 min, posteriormente, se lavaron los portaobjetos por 3 ocasiones con PBS pH 7.2 en agitación, en seguida se permeabilizaron las células con solución de Tritón X-100 al 0.2% por 10 min y se lavaron las células 2 veces con PBS, posteriormente se incubaron con 200 µL de solución de albúmina al 2% para bloquear los sitios inespecíficos durante 20 min a 37°C, se lavaron dos veces más con PBS y se incubaron con el anticuerpo acoplado a FITC (Anti-CD25-FITC) diluido 1:50 en PBS, en seguida se colocaron en una cámara húmeda en total oscuridad una 60 min a 37°C.

Después del tiempo de incubación los pozos se lavaron con PBS-Tween al 0.01% dos veces y 3 veces con PBS. Para visualizar los núcleos se montaron los portaobjetos en oscuridad con VectaShield conjugado con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector, USA) sellando los cubreobjetos con barniz. Como control positivo se utilizó la línea celular Jurkat que expresa la subunidad α del receptor de interleucina 2 (CD25) tratándola de igual manera que los hemocitos. Se observaron en un microscopio Leica DM/SL (Wetzlar, GMBH) con aumentos de 40X, 63X 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).

Para descartar cualquier modificación en la inmunolocalización de las proteínas reconocidas por el proceso de adhesión o el estrés en la manipulación, se extrajeron hemocitos con PFH al 2% con anticoagulante para crustáceos en relación 1:2, se dejaron fijar por 15 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron a 300 x g 8 min a 4°C y se lavaron

con PBS tres veces, se contaron las células y suspendieron en 1 mL de PBS, y separaron en 2 tubos Eppendorf, a uno de los tubos se le agregó Triton X-100 al 0.2% para impermeabilizar, el otro se resuspendió en PBS, y se siguió la metodología descrita anteriormente para el marcaje con anti-CD25-FITC.

Electroforesis bidimensional (2D)

Se realizó una separación bidimensional, en primera instancia por isoelectroenfoque (primera dimensión) el cual realiza un desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial y un gradiente de pH. Posteriormente se separan por tamaño (segunda dimensión) en gel de poliacrilamida. Esto se hizo a partir de un lisado de hemocitos totales, se procesaron 100 µg de proteína se trataron con una mezcla de urea 8M, CHAPS 0.5 %, Ditiotreitól (DTT) 0.2 %, anfólitos IPG Buffer pH 3-10 y azul de bromofenol 0.002%, hasta tener un volumen total de 130 µL. Se aplicaron las muestras en los carriles de la bandeja de rehidratación (Amersham, Biosciences). Se colocaron tiras de poliacrilamida de 7 cm de longitud y un rango de pH 3 a 10, (GE Healthcare, Bio-sciences, United Kingdom). Cada carril se cubrió con aceite mineral e incubó a temperatura ambiente por 12 h.

Posteriormente, se colocaron las tiras en la cámara (Multiphor II Amersham, Biosciences, United Kingdom) y se realizó un isoelectroenfoque en tres fases: la primera a 200 V, por 1 min, a 0.001 kilovolts por hora (kVh); la segunda a 3500 V, por 90 min, a 2.8 kVh, y finalmente a 3500 V, durante 35 min a 2.2 kVh. Para la segunda dimensión, las tiras se equilibraron en 10 mL de amortiguador de equilibrio (Tris HCl 50 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 30 %, SDS 2 %, y azul de bromofenol 0.002 % y DTT 65 mM), en agitación constante por 15 min a temperatura ambiente, se desechó la solución anterior e incubó nuevamente con 10 mL de amortiguador de equilibrio, con iodoacetamida 135 mM durante 15 min en agitación constante. El gel separador se preparó con acrilamida al 12.5%, en una cámara de electroforesis vertical, en la parte superior se situó la tira con el marcador de peso molecular embebido en un gel de agarosa al 0.5 %, la electroforesis se corrió a 80 V por 4 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Se realizó la inmunoelectrotransferencia, descrita anteriormente por el método de Towbin en membranas de nitrocelulosa, enseguida se le realizó Western-Blot con anti-CD25 Peroxidasa en las condiciones ya descritas.

Secuencia de la proteína identificada por anti-CD25 por espectrometría de masas

Posterior a la separación por electroforesis bidimensional, los puntos reconocidos por el antiCD25, que contenían las fracciones de proteína, se retiraron del gel con una hoja de bisturí y se sometieron a hidrólisis con 50 µg de tripsina en 500 µL de bicarbonato de amonio, pH 8.0 por 24 h, 37 °C. La actividad enzimática se inhibió al mantener la mezcla a 2 °C por 4 h. La enzima y las muestras digeridas se secaron por evaporación usando un Gyrovap (Howe, Londres) y se prepararon directamente mezclando en la matriz 1 mL del producto de reacción (50 pM) y 1 mL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico, se dejó cristalizar la mezcla a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos se determinaron por tiempo de vuelo, en un espectrofotómetro de masas Visión 2000 (MALDI, Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa se determinaron en modo reflectrón bajo 8 keV de voltaje de aceleración y detección positiva. Como control se usó Tripsina, para identificar los péptidos libres y angiotensina como estándar (Mr 296.7). Las masas de los iones digeridas se compararon en la base de datos NCBI nr gi343129219.

Después de obtener la secuencia homóloga se insertó la secuencia en el sistema computacional ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/>) para determinar sitios potenciales de N-glicosilación y O-glicosilación.

Efecto de anti-CD25 en los hemocitos para la producción de radicales libres de oxígeno

Para determinar si existía un reconocimiento en membrana se determinó si presentaría reconocimiento en la superficie, generar el posible entrecruzamiento y desencadenar un estrés oxidativo. Se utilizaron anticuerpos que reconocieran CD25 pero de una clona diferente. Para la determinación del estallido respiratorio se utilizaron monocapas de hemocitos en medio Grace (1×10^5 células/pozo), las células se dejaron adherir en placas de 96 pozos con fondo plano (NUNC, Dinamarca) durante 15 min a 4 °C, posteriormente, se añadieron 50µL de anti-CD25 1µg clona PC61, Isotipo IgG₁ 1µg, anti-CD25-Biotina clona PC61.5 1µg, acetato de forbol mirístato (PMA, Sigma Chem Co, St Louis Mo. USA) 7.5 ng, diphenyleneiodonium (DPI, Sigma Chem Co, St Louis Mo. USA) 20mM e incubaron por una 60 min a 37 °C, se retiró el sobrenadante e incubaron los pozos con 100

μL de Nitroazul de tratazolium al 0.2% (NBT, Sigma), en PBS, 60 min a 37°C. A continuación, las placas se lavaron con PBS y metanol al 70%; se añadieron 120 μL de KOH 2 M y agitó lentamente por una hora, en seguida se agregaron 140 μL de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma, USA). La absorbancia por la coloración obtenida se determinó leyendo la placa a 630 nm en un lector de ELISA (Labsystems, Multiskan MS, Finlandia), contra un blanco de una solución de NBT. La reducción del NBT se reportó como nM de NBT reducido (NBTr/monocapa), considerando el valor del coeficiente de extinción molar de NBTr de 0.1 DO a 630 nm que representa 1.9 nM de O_2^- (Rojas *et al.*, 2001).

También para determinar si existía un posible receptor para la IL-2 que realizara un activación celular se realizó una estimulación con IL-2 murino (Affimetrix, ebioscience, San Diego, USA.) en concentraciones crecientes desde 1 a 10 ng para determinar la producción de especies reactivas de oxígeno por estímulo de la citocina.

Estimulación de hemocitos con PMA y DPI

Los hemocitos se centrifugaron a 300 x g por 8 min a 4°C, y se resuspendió en 500 μL de medio Grace (Invitrogen, United Kingdom) se tomaron 100 μL (conteniendo 1×10^5 células) de esta suspensión y se colocaron en portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma) delimitando los pozos con un marcador hidrofóbico, se incubaron a 4°C por 15 min permitiendo la adhesión, posteriormente se retiró el exceso, a un pozo se adicionó medio Grace, a otro se le agregó PMA 7.5 ng/mL y a otro PMA 7.5 ng/mL con DPI 25 μM y se dejó incubar a 28 °C por una 60 min, después se retira el exceso de suspensión y se fijan las células con PFA al 2% en agitación constante a 4°C, 15 min, posteriormente, se lavaron los portaobjetos por 3 ocasiones con amortiguador de fosfatos salina (PBS) pH=7.2 en agitación, en seguida se incubaron con 200 μL de albúmina al 2% para bloquear los sitios inespecíficos durante 60 min a 37°C, se lavaron dos veces con PBS. Para permeabilizar las células se incubó el portaobjetos con Tritón X-100 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) diluido 1:50 en PBS, a continuación se colocaron en una cámara húmeda en total oscuridad permaneciendo ahí por 60 min a 37°C. Después del tiempo de incubación 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) sellando los cubreobjetos con barniz. Se observaron en un microscopio Leica DM/SL (Weslar, GMBH) con aumentos de 40X, 63X 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).

Para la activación, los hemocitos se centrifugaron a 300 x g por 8 min a 4°C y se resuspendieron en 1 mL de medio Grace. Se volvió a centrifugar a 300 x g, 8 min a 4 °C, se resuspendieron en mL de Grace. Se colocaron 1×10^6 cel/mL por cada condición, para el estado basal se colocó medio Grace para la activación se utilizó PMA 7.5 ng/mL, para la inhibición se adicionó PMA 7.5 ng/mL más DPI 25µM, por cada 1×10^5 células. Posteriormente se dejaron estimular durante 60 min, se centrifugaron 300 x g, 10 min. a 4°C. Y se lisaron de acuerdo a la técnica ya descrita anteriormente.

Se tomaron 50 µg de cada uno de los lisados celulares y se realizó la corrida electroforética siguiendo el método descrito por Laemmli (1970), se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% con SDS, en condiciones reductoras. Posteriormente se realizó una transferencia a membranas de nitrocelulosa, por el método descrito por Towbin *et al* (1979) en un aparato Trans-Blot SD semiDry Transfer Cell (Bio Rad) a temperatura ambiente con voltaje constante (25V) por 60 min. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS durante 60 min a 37°C, posteriormente, las membranas se lavaron con PBS-Tween 20 al 0.01% (PBS-T) 5 veces, en agitación, 5 minutos por cada lavado. Se adicionó el anticuerpo acoplado a peroxidasa (Anti-CD25-Px), en dilución 1:50 se incubó 90 min a 37°C, después del lapso de incubación se lavó la membrana con PBS-T cinco veces, 5 minutos cada lavado. Para visualizar el reconocimiento se utilizó solución de revelado (Diaminobencidina (DAB) 6 mg, 50µL de H₂O₂ 30%, 12 mL de PBS) por 15 seg, se detuvo la reacción con agua destilada.

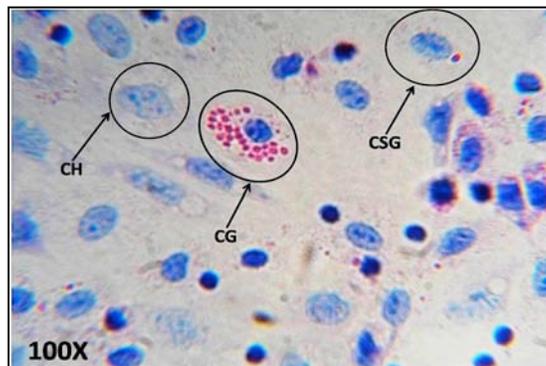
RESULTADOS:

Las langostas se encuentran en un estado de intermuda en este estado presentan exoesqueleto rígido facilitando su manipulación sin que haya retracción, hay pigmento epidérmico del exoesqueleto; permitiendo tener a la población en un mismo estadio (Peebles 1977).



Tinción hematoxilina-eosina:

En la imagen 2 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 (H) que no presentan gránulos, un núcleo ácido de forma alargada y definida que ocupa la mayor parte de su citoplasma. Los hemocitos de tipo granular (G) con un núcleo ácido pero de menor tamaño respecto a su citoplasma y con gránulos básicos distribuidos en su citoplasma y los semigranulares (SG) que presentan un núcleo intermedio en comparación de las otras dos poblaciones y escasos gránulos básicos en el citoplasma. La proporción en cantidad es alrededor de un 50% de hemocitos hialinos, un 35% de semigranulares y 15% de granulares. La mayoría de las células se adhieren bien a la superficie extendiendo una variedad de filopodios con mayor cantidad las hialinas, mientras que las granulares y semigranulares en menor cantidad de extensiones.



Inmunocitoquímica

En la inmunocitoquímica a hemocitos de langosta, con células extraídas con paraformaldehído y anticoagulante., las cuales se trataron sin modificar su integridad de la membrana y otras permeabilizando con un detergente. Como se puede notar en la figura 5 se observa que los hemocitos permeabilizados presentan marca en gránulos citoplasmáticos, marcando las poblaciones de tipo granulares (G) y semigranulares (SG), mostrando que la marca esta definida en el interior de las células delimitadas por los gránulos, mientras que los hemocitos hialinos (H) son negativos.

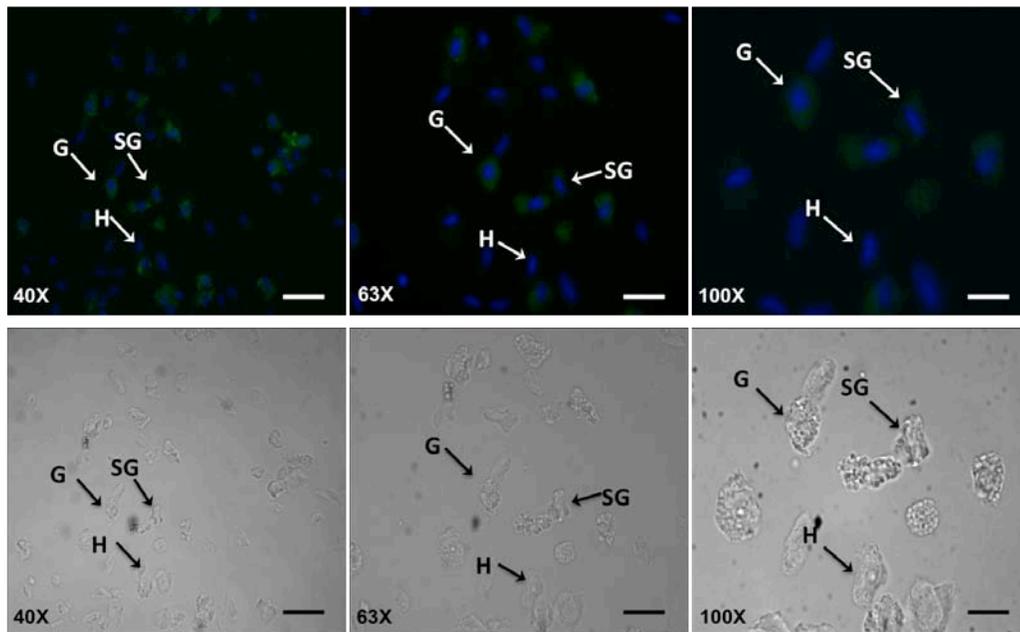


Figura 5.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *C. quadricarinatus* permeabilizados y marcados con AntiCD25-FITC (verde) y DAPI (Azul). Aumento 40X, 63X y 100X.

La inmunocitoquímica en hemocitos no permeabilizados no mostraron marcaje (Figura 6) ni reconocimiento en la superficie, al no mostrar marca en el citoplasma por la falta de permeabilidad en la membrana el anticuerpo no logro penetrar al interior, solo se pudo detectar el marcaje del núcleo (azul). Mientras que al comparar con células a las que se les permitió adherir a la superficie y formar filopodios, que la marca se mantiene en citoplasma no se modifica en una activación como la adhesión y no se moviliza(Figura 7).

A

B

C

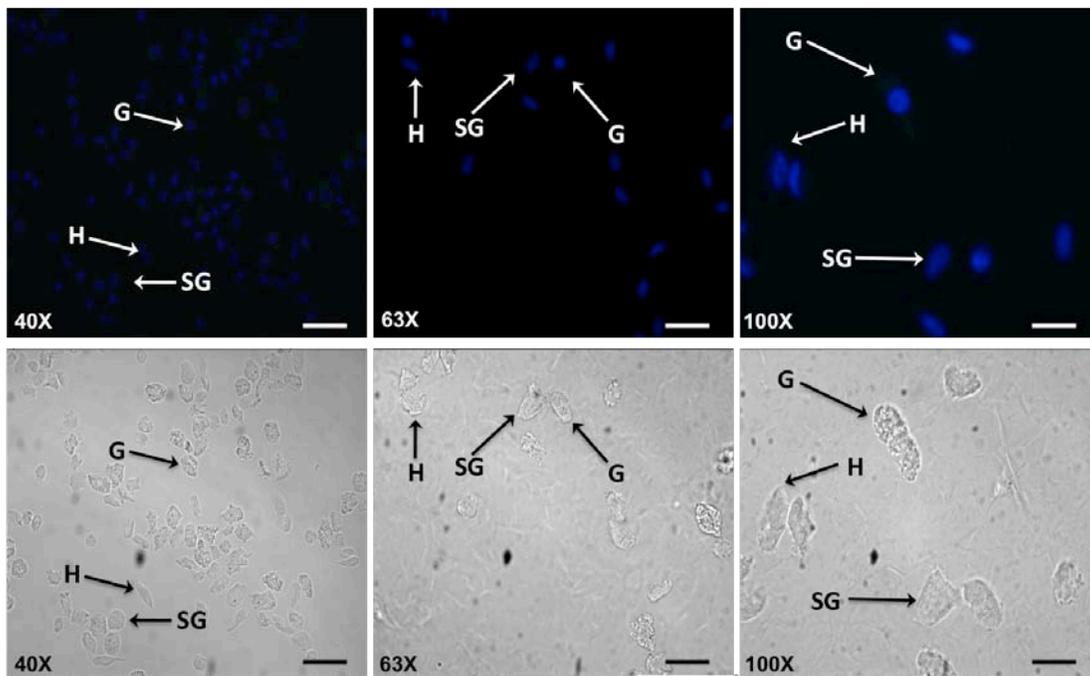


Figura 6.-Inmunocitoquímica en hemocitos de *C. quadricarinatus* sin permeabilizar y marcados con AntiCD25-FITC (verde) y DAPI (Azul). Aumento 40X, 63X y 100X.

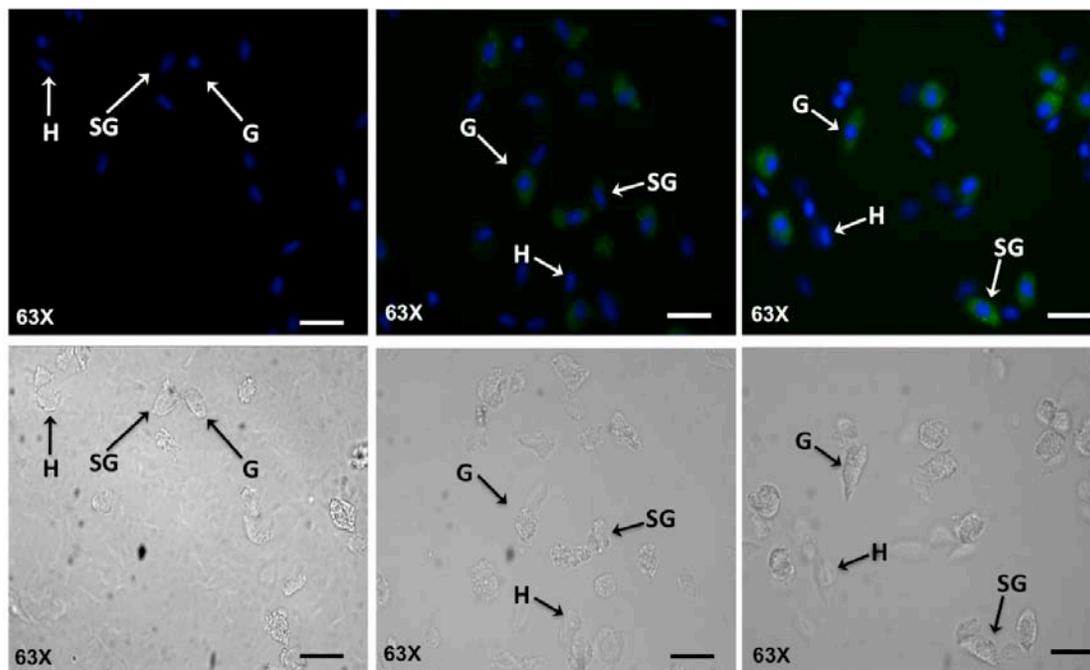


Figura 7.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *C. quadricarinatus* (A) sin permeabilizar , (B) permeabilizados y (C) hemocitos adheridos 15 min permeabilizados, marcados con AntiCD25-FITC (verde) y DAPI (Azul). Bar 10 μ m

Electroforesis SDS-PAGE

En figura 8 se puede observar la migración electroforética del lisado total de hemocitos, que mostró múltiples bandas con pesos moleculares que fluctuaron entre 200 y 21 kDa., la presencia en cantidad se encuentra entre 97 y 45 kDa.

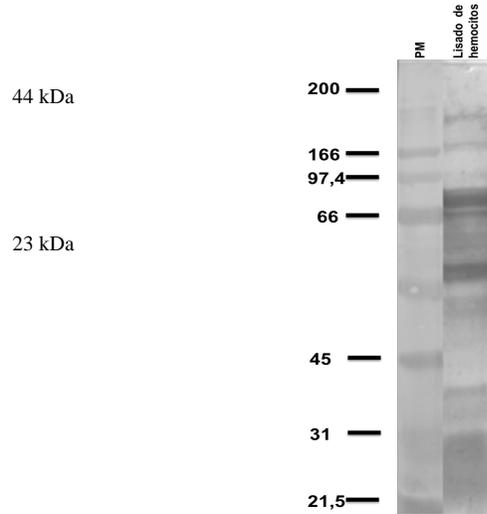
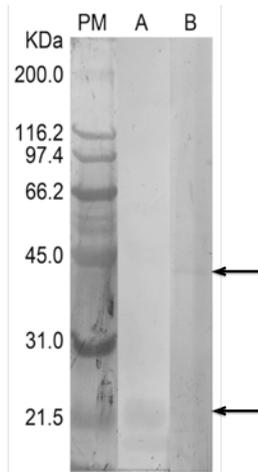


Figura 8- Electroforesis desnaturalizante 8SDS-PAGE).. Marcadores de peso molecular (PM) en kDa, 200 (miosina), 166 (β-galactosidasa), 97.4 (fosforilasa b), 66 (Albumina sérica bovina), 45 (Ovoalbumina), 31 (Anhidrasa carbónica), 21 (Inhibidor de tripsina de soya).Carril 2- lisado de hemocitos (50 µg). Transferencia en nitrocelulosa teñido con amido negro.

Inmunoelectrotransferencia:

El Western-Blot, se reveló con anti-CD25-peroxidasa, como se muestra en la figura 9 en el lisado de hemocitos se observa reconocimiento en una fracción de peso molecular aproximado de 23 kDa (A), como control positivo (B) el lisado de Jurkat reveló una banda de 44 kDa que corresponde al receptor para Il-2 (CD25).



Electroforesis bidimensional (2D):

Después del isoelectroenfoque en tiras con un rango de pH de 3 a 10 se realizó una separación por tamaño en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras. Obteniéndose distintas fracciones proteicas entre 200 y 21 kDa, de estos la mayoría se localizan en el rango de punto isoeléctrico de 3 a 9, se identifican dos fracciones predominantes de 23 y 21 kDa.

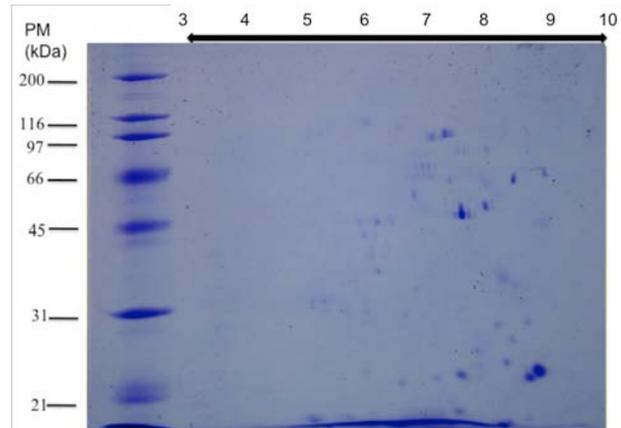


Figura 10- Electroforesis bidimensional de lisado de hemocitos de *C. quadricarinatus*, pesos moleculares en kDa y los puntos se encuentran distribuidos de acuerdo a la escala de pH (3 a 10)

Inmunoelectrotransferencia de la 2D

El Western-blot, se reveló con anti-CD25-peroxidasa, como se muestra en la figura 11 se observa un conjunto de fracciones definidas alrededor de 21 kDa con un punto isoeléctrico aproximado de 8.6 posiblemente sean proteínas con pI muy cercanos y de peso similar.

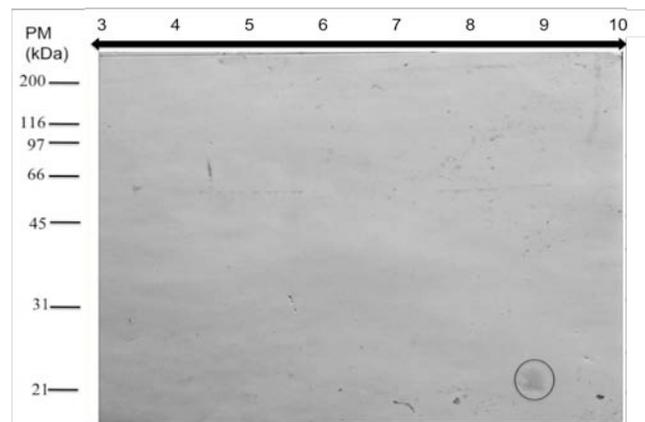


Figura 11- Western-blot del lisado de hemocitos de *C. quadricarinatus*, separado por electroforesis bidimensional, pesos moleculares en kDa, se encierra en un círculo las proteínas reconocidas por anti-CD25.

Secuencia de la proteína reconocida por anti-CD25

Tras la electroforesis bidimensional y el western-blot, se determino que correspondía en peso y tamaño a las isoformas de 21 y 23 kDa a los puntos reconocidos por el anti-CD25, se secuenciaron por espectroscopia de masas y los resultados se compararon con una base de datos para encontrar similitudes, solo la isoforma de 23 kDa se encontró similitud con el inhibidor de interleucina 1A (IL-1RA), NCBI nr gi343129219.

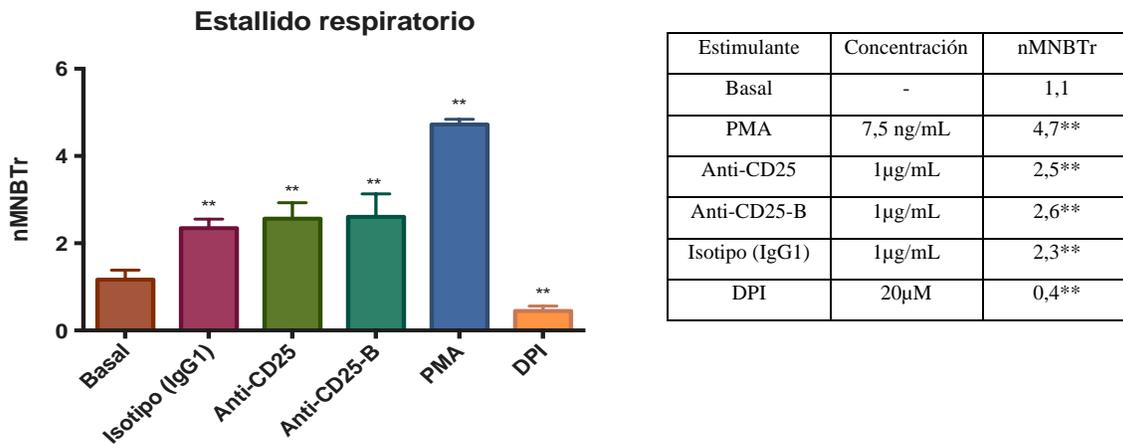
1	RPSGRKSSKM	QAFRIWDVNVQ	KTFYLRNNQL	VAGYLQGPV	NLEEKIDVVP
51	IEPHALFLGI	HGGKMCLSCV	KSGDETRLQL	EAVNITDLSE	NRKQDKRFAF
101	IRSDSGPTTS	FESAACPGWF	LCTAMEADQP	VSLTNMPDEG	VMVTKFYFQE
151	DEGGGGSDAH	KSEVAHRFKD	LGEENFKALV	LIAFAQYLQQ	CPFEDHVKLV
201	NEVTEFAKTC	VADESAENCD	KSLHTLFGDK	LCTVATLRET	YGEMADCCAK
251	QEPERNECFL	QHKDDNPVLP	RLVRPEVDVM	CTAFHDNEET	FLKKYLYEIA
301	RRHPYFYAPE	LLFFAKRYKA	AFTECCQAAD	KAACLLPKLD	ELRDEGKASS
351	AKQRLKCASL	QKFGERAFKA	WAVARLSQRF	PKAEFAEVSK	LVTDLTKVHT
401	ECCHGDLLEC	ADDRADLAKY	ICENQDSISS	KLKECCEKPL	LEKSHCIAEV
451	ENDEMPADLP	SLAADFVESK	DVCKNYAEAK	DVFLGMFLYE	YARRHPDYSV
501	VLLRLAKTY	ETTLKCCAA	ADPHECYAKV	FDEFKPLVEE	PQNLIKQNCE
551	LFEQLGEYKF	QNALLVRYTK	KVPQVSTPTL	VEVSRNLGKV	GSKCCKHPEA
601	KRMPCAEDYL	SVVLNQLCVL	HEKTPVSDRV	TKCCTESLVN	RRPCFSALEV
651	DETYVPKEFN	AETFTFHADI	CTLSEKERQI	KKQTALVELV	KHKPKATKEQ
701	LKAVMDDFAA	FVEKCKKADD	KETCFAEEGK	KLVAASQAAL	GL

Tabla 1.- Secuencia de proteínas obtenidas espectrometría de masas por ionización por electrospray (MS/ESI), los varios péptidos marcados en rojo son los que presentan un homología del 27%. Sombras amarilla corresponde a la sitios potenciales de N-glicosilación y sombra magenta a O-glicosilación.

La base de datos de ExPASy analizo que la secuencia contiene un punto de N-glicosilación y 8 sitios potenciales de O-glicosilación.

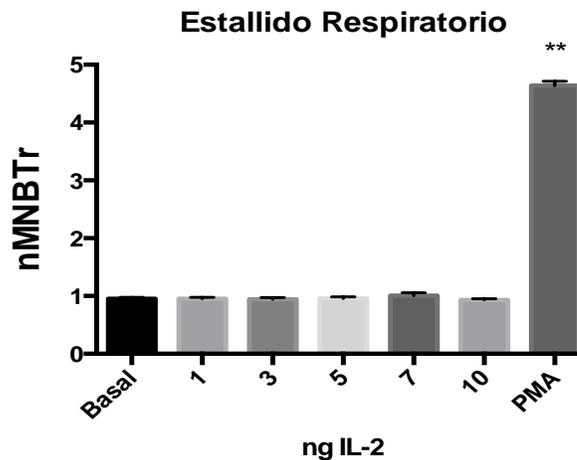
Estallido respiratorio

Para determinar la función de un posible receptor similar al receptor de CD25 en hemocitos se utilizaron anticuerpos contra CD25 de distintas clonas de PC61 y PC61.5 que reconocen la misma proteína, se determinó la producción de radicales libres de oxígeno por la reducción del NBT a Formazan (nMNBTr), la generación de ROS causado por anticuerpos es al menos 2 veces más al compararlos con el basal en los anticuerpos de distintas clonas y el de isotipo, mientras que al comparar los anticuerpos entre si no existe diferencia..



Grafica 1.-Determinación de nanomoles de NBT reducidos (NMNBTr), en hemocitos de *Cherax quadricarinatus* Estimulados con Anticuerpo anti-CD25, Acetato de forbol miristato (PMA), difenileno iodonium (DPI). Control de Isotipo (IgG1), diferencia significativa ** $p < 0.05$ determinada por la prueba de U-ManneWhitney (n= 6).

Posteriormente se realizo un estimulo con IL-2 para determinar si existía un posible receptor para esta citocina en vertebrados puede ser reconocida por distintas subunidades que presenta IL-2R; o pudiera tener un posible receptor, además de que si era posible que fuera dosis dependiente. Al evaluar los valores no se encontró diferencia entre las concentraciones de IL-2, respecto al basal.



Grafica 2.- Determinación de nanomoles de NBT reducidos (nMNBTr), en hemocitos de *Cherax quadricarinatus* con IL-2 en concentraciones de 1, 3, 5, 7 y 10 ng. PMA (7.5 ng/mL). diferencia significativa ** $p < 0.05$, determinada por la prueba de U-ManneWhitney (n=6).

Inmunocitoquímica en hemocitos tratados con IL-2

Para determinar si la estimulación con IL-2 modificaba la morfología o afectaba la localización de la proteínas reconocidas. En la figura 12 se observan los resultados de la inmunocitoquímica en donde no muestra cambio en la localización del reconocimiento, aun

delimitado en los gránulos, no se modifica algún cambio en las hialinas, mientras que en las células con gránulos no hubo cambio en la intensidad ni difusión exceptuando el valor de 10ng el cual se nota un proceso de difusión de la marca sin delimitación de los gránulos.

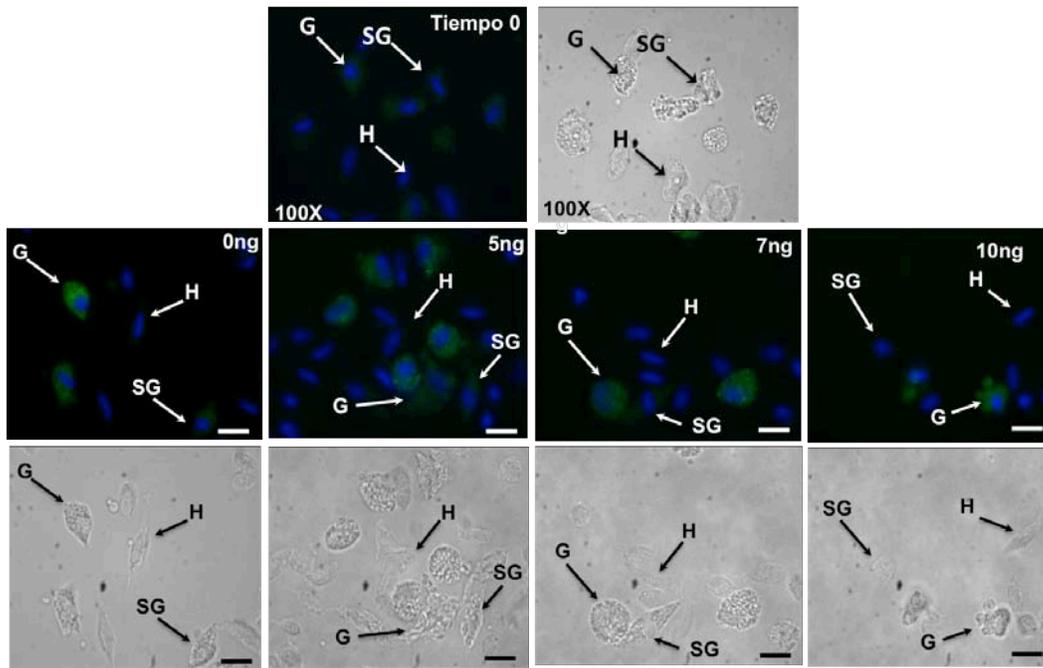


Figura 12.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *Cherax quadricarinatus* en presencia de IL-2 de 0, 5, 7 y 10 ng. a 30 min de estímulo, aumento 100X. La concentración 0 es medio Grace así como el tiempo 0. Aumento 63X. (Verde anti-CD25-FITC, azul DAPI)

Estimulación de hemocitos con PMA y DPI

Para poder determinar la posible participación de las proteínas similares a CD25 en un mecanismo asociado a la generación de ROS por activación de la NADPH oxidasa se determino estimulando con PMA e inhibiendo la activación de especies reactivas de oxígeno con DPI. Los hemocitos estimulados con PMA lograron incrementar la intensidad de la marca (++) (Figura pero se mantuvo en los gránulos citoplasmáticos, otro cambio fue la morfología en donde se disminuyo el numero de extensiones o filopodios, adquiriendo una forma redonda, al inhibir las especies reactivas de oxígeno la marca se ve disminuida en los gránulos y los hemocitos modificaron su morfología haciendo mas extensiones de forma focalizada.

A

B B

C

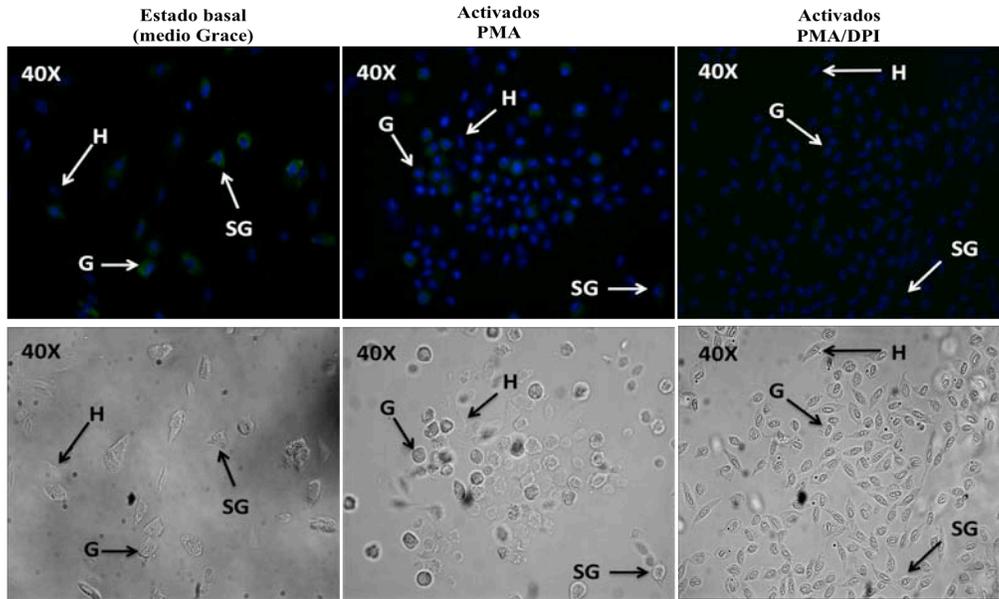


Figura 13.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *Cherax quadricarinatus*. Estado basal (A), Activados con PMA 7.5 ng/mL (B) y Activados con PMA (7.5 ng/mL) y DPI (25 μ M) (C). Durante 1 hora, verde anti-CD25-FITC, azul DAPI. Aumento 40X..

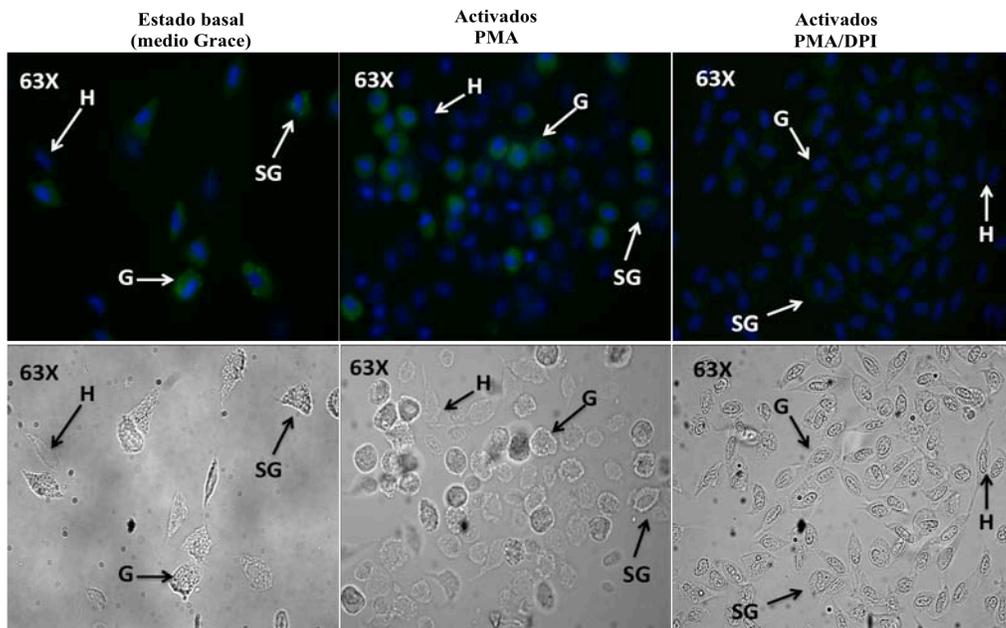


Figura 14.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *Cherax quadricarinatus*. Estado basal (A), Activados con PMA 7.5 ng/mL (B) y Activados con PMA (7.5 ng/mL) y DPI (25 μ M) (C). Durante 1 hora, verde anti-CD25-FITC, azul DAPI. Aumento 63X

A

B

C

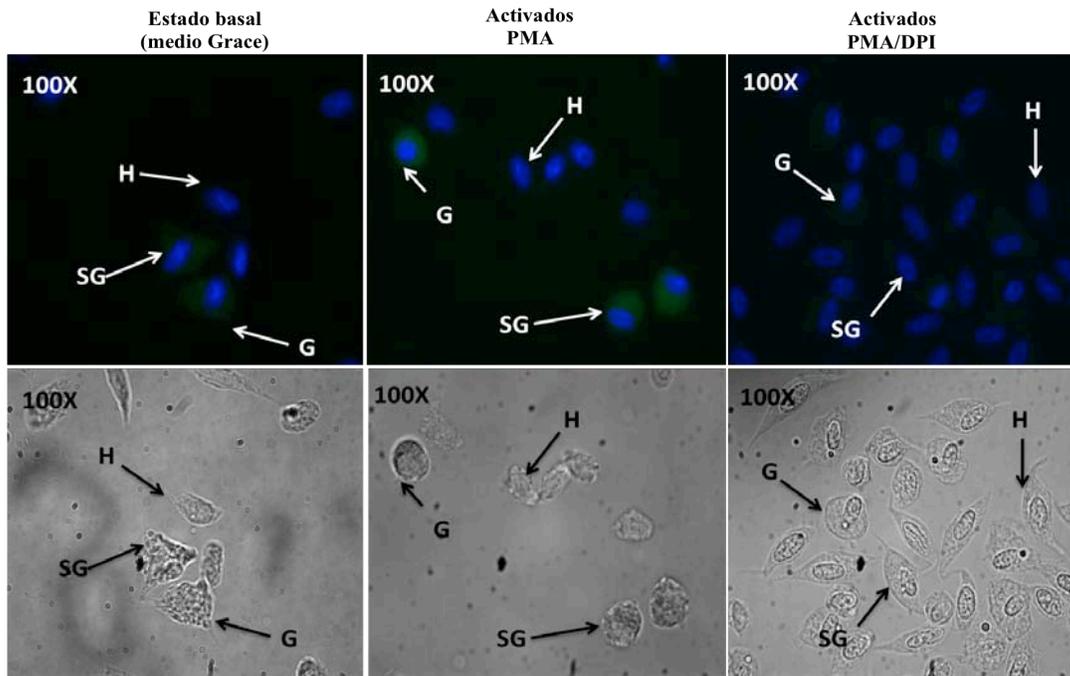


Figura 15.- Inmunocitoquímica en hemocitos de *Cherax quadricarinatus*. Estado basal (A), Activados con PMA 7.5 ng/mL (B) y Activados con PMA (7.5 ng/mL) y DPI (25 μ M) (C). Durante 1 hora. Verde anti-CD25-FITC, Azul DAPI. Aumento 100X.

Después de realizar la electroforesis SDS-PAGE de los lisados celulares estimulados en las diferentes condiciones y realizar el western-blot, se obtuvo el reconocimiento de la banda de 23 kDa en un estado basal aumentando la intensidad en la activación con PMA además se revela otra banda alrededor de 54 kDa, mientras que la inhibición se conserva la banda de 23 kDa pero con una disminución en la intensidad y la banda de 54 se pierde completamente.

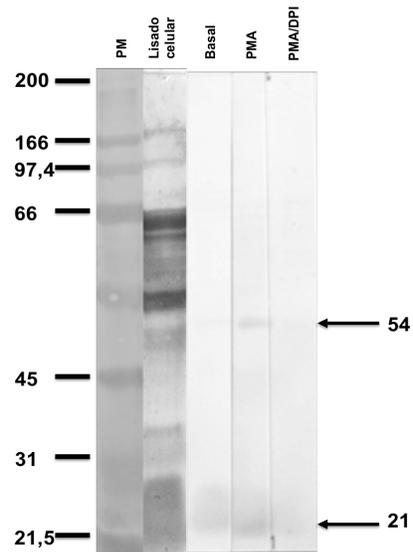


Figura 16. Western-blot revelado con antiCD25-Px. De derecha a izquierda. Pesos moleculares 200 (miosina), 166 (β -galactosidasa), 97 (fosforilasa b), 66 (Albumina sérica bovina), 45 (Ovoalbumina), 31 (Anhidrasa carbónica), 21 (Inhibidor de tripsina de soya). Lisado de hemocitos en estado basal, lisado de hemocitos activados con PMA 7.5 ng/mL, lisado de hemocitos activados con PMA 7.5 ng/mL e inhibidos con DPI 25 μ M.

Discusión:

En invertebrados los hemocitos en circulación constituyen una barrera celular de protección contra microorganismos invasores, además de su participación en los distintos mecanismos de la inmunidad humoral (Cerenius y Söderhäll, 2004). En general los crustáceos presentan cuando menos 3 diferentes tipos de hemocitos, las células hialinas (H), células semigranulares (SG) y células granulares (G). La falta de marcadores celulares de diferenciación (CD) no facilita el establecimiento de linajes específicos, lo que es más el origen de las estirpes aún no está dilucidado completamente, se han encontrado similitudes morfológicas para estas células, como granularidad y tamaño (Lavine *et al.*, 2002).

Se ha descrito que en la hemolinfa los hemocitos intervienen en la inmovilización y destrucción de los patógenos invasores, después del reconocimiento por los receptores de agentes patógenos (Johansson *et al.*; 2000). La existencia de parámetros fisiológicos inherentes a los crustáceos como el cambio de cutícula (exuvia) que varía de acuerdo a la estación del año o periodo de reproducción y otros procesos intervienen en las características morfológicas, nutricionales (Wheatly y Ayer, 1995) e inmunológicas de los crustáceos. El estadio en donde se tiene valores estables con un periodo de duración razonables para su manipulación, es el estado de intermuda el cual se caracteriza por la dureza del caparazón que permite la manipulación y su periodo de duración varía entre 29 y 79 días (Wickins y Beard, 1974), mientras que en un estado de postmuda con exoesqueleto palpable y bastante flexible no permite una manipulación eficiente.

El reconocimiento de lo propio de lo extraño es fundamental en contra de infecciones causadas por patógenos, la presencia de proteínas de reconocimiento de este material extraño puede desencadenar en distintos mecanismo de defensa que culminan con la eliminación del patógeno, de tal forma que la identificación de las células participantes en los mecanismo de defensa es de gran trascendencia, así como el determinar algunas propiedades morfológicas de los hemocitos de *Cherax quaricarinatus*; Esta identificación se efectuó por tinción de hematoxilina-eosina, donde se encontraron 3 poblaciones celulares de hemocitos en circulación, las células hialinas (H), las semigranulares (SG) y las granulares (G) coincidente con reportes previos de otros crustáceos, donde los hemocitos de tipo hialinas se encuentran en mayor cantidad (50%), seguidas de células semigranulares

(35%) y por último las células granulares (15%). Para su clasificación se consideró exclusivamente la morfología, el tamaño y la presencia de gránulos básicos citoplasmáticos. La organización basada en las funciones que desempeñan es complicada debido a que diferentes grupos celulares tienen funciones similares, por ejemplo las células SG y G tiene la capacidad de desencadenar la cascada de la proPO en un cangrejo de agua dulce, las G y SG desarrollan funciones de encapsulación en hemocitos de insectos, características asociadas al contenido granular de estos hemocitos, mientras que las H y SG 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.

La diversidad de funciones, es un indicio de la gran plasticidad que podrían tener los hemocitos y como desencadenan distintos mecanismos inmunes dependiendo del estímulo, lo que apoya la teoría de que su inmunidad innata con la que cuentan no es inespecífica, sino selectiva al reconocimiento del patógeno invasor, manteniendo una estricta regulación al activar los mecanismos efectores, en comparación con las células de vertebrados que necesitan un gran repertorio celular para desempeñar algún proceso en específico, lo que ocasiona un nivel de complejidad en diversidad celular y un proceso de especialización de gran envergadura

Algunas de las funciones específicas que desempeñan los hemocitos, se han demostrado al separar las poblaciones, en el cangrejo *Carcinus maenas* los hemocitos hialinos tienen como función principal fagocitar, mientras que las SG 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, proteínas de adhesión celular, crustinas, péptidos antimicrobianos (Sricharoen *et al*; 2005) participan en funciones de protección. Otras actividades basadas en el estímulo de los hemocitos, como la exocitosis la realizan SG y G en respuesta a polisacáridos microbianos, lo que lleva a la liberación de proteínas inmunes (Lavine y Strand, 2002). Algunos estudios sugieren que las diferentes funciones que desempeñan los hemocitos, son características de cada tipo de crustáceo, por lo que 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. El estudio

de los invertebrados se ha enfocado en gran medida al estudio de la hemolinfa, (fracción soluble o suero) y no a la parte celular pues no ha sido posible mantener viables a los hemocitos por tiempos prolongados para analizar mejor su comportamiento así como los distintos mecanismos de defensa en los que participan.

El desarrollo de sistemas de cultivo celular en invertebrados en general, ha tenido un éxito limitado (Power *et al.*, 1998), fallas que se han sido relacionado 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 que se han desarrollado en base a los nutrientes que necesitan los diferentes tipos celulares, la mayormente 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 medios de cultivo han demostrado su eficiencia para preservar el cultivo de hemocitos, como el Leibovitz L-15, con 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) midiendo la incorporación de Bromouridina (BrU). La viabilidad del medio Grace para insectos son comparables a otros como el RPMI, las células logran mantenerse estables y viables; por lo que podríamos considerarlos como el medios idóneo 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.

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 tanto de los grupos celulares como los factores humorales generados contra antígenos específicos, como se ha demostrado en mamíferos (Hoffmann *et al.*, 1999; Iwanaga y Lee, 2005). En invertebrados los mecanismos de defensa dependen completamente del sistema inmune innato, que puede ser activado por diferentes moléculas como los PAMPs, que 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 (Vazquez *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 junto con las distintas 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, que 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 similar a IL-2 (IL-2-like) en un tipo de ave de Turquía la cual presenta un 24% de homología estructural a la proteína de humano, 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 son producidos por 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. Algunos 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 *et al.*, 2010).

En los conteos diferenciales con la presencia de los tipos celulares como hialinas, granulares y semigranulares es similar en con otros crustáceos (Smith, 2010) , pero la cantidad de cada uno varía dependiendo del invertebrado, aunque los reportes de invertebrados que presentan alguna de las subunidades del IL-2R como en el mejillón nos reportan 2 poblaciones de las de tipo hialino y las de tipo granular, las células que son positivas a CD25 son de tipo granular, que se asemeja al reportado en el mejillón donde también presenta CD25, pero el reporte en mejillón es en membrana mientras que en *Cherax* la marca es en citoplasma. Posiblemente tenga una función de regulación intracelular en la langosta mientras que en *Mytilus* sea asociada a reconocimiento de agentes patógenos (Barcia *et al.*, 1999). En este trabajo identificamos la presencia de proteínas que comparten epítopes con la subunidad α del receptor de interleucina 2 (CD25)

en hemocitos de langosta *Cherax quadricarinatus*, revelando su presencia exclusivamente en las células granulocíticas. La presencia de CD25 se corroboró por la inmunoelectrotransferencia del lisado celular de hemocitos, pudiéndose identificar una banda alrededor de 23 k Da, que presenta una intensidad considerable en el lisado celular (Figura 2), el peso molecular no coincide con el reportado en vertebrados, de aproximadamente 50 kDa; Aunque 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 pesos moleculares 50, 70 y 45 kDa respectivamente (Barcia *et al.*, 1999). Ensayos que denotaban que la marca es en la superficie celular de los hemocitos, mientras que en hemocitos de *C. quadricarinatus* se demostró que la marca solo esta situada en los gránulos (Figura 3). Esta aseveración es asociada también por que al realizar una inmunocitoquímica con células fijadas sin permeabilizar no existe marcaje en la periferia celular (Figura 4), mientras que después de permeabilizar se logra observar la marca en gránulos citoplasmáticos y en un proceso de adhesión celular donde se ve la extensión y generación de filopodios, la inmunolocalización de los gránulos no se moviliza ni se modifica su intensidad.

La generación de especies reactivas de oxígeno por adición del anticuerpo fue asociado por el posible reconocimiento en membrana por receptores celulares (Grafica 1) que fue debido posiblemente a la presencia de proteínas como lectinas en membrana que podrían reconocer los sacáridos (Zenteno *et al.*, 2000), presentes en glicoproteínas como anticuerpos, desencadenando la producción de ROS. Esto nos sugiere que el contenido granular, esta preformado durante el proceso de hematopoyesis (Wu *et al.*, 2008) en el hepatopancreas o posiblemente en otros tejidos hematopoyéticos que posteriormente salen a circulación para desempeñar algunos mecanismo de defensa asociados a su tipo celular.

Existen reportes de cristalografía y modelos tridimensionales sobre la interacción de que la IL-2 puede interaccionar con las 3 subunidades del receptor (Stauber *et al.*, 2006) ocasionando activación y efectos que dependen de las constantes de disociación con la IL-2. Con base a esta información, después de estimular a los hemocitos con IL-2 se determino si era posible ocasionar algún efecto en la localización de CD25 por estímulo de IL-2. No se detecto un cambio en la localización ni en la intensidad de la marca, esto concuerda con los resultados de que no se presenta en membrana y por consecuencia no interacciona con

la citocina, además el determinar si la IL-2 podría ocasionar algún cambio inherente a ella como la proliferación o supervivencia, se complica por la falta de cultivos celulares estables, la poca viabilidad celular en periodos largos de tiempo, pero es posible determinar algún cambio sobre un mecanismo de defensa como la generación de ROS, se midió que los cambios en la generación de especies reactivas de oxígeno no presentan diferencias significativas. Es interesante plantear que nuestros resultados nos indican que los epitopes de CD25 encontrados en hemocitos de *C. quadricarinatus* no se encuentra en membrana como lo reportado en otros invertebrados, no se moviliza al estimular con su ligando IL-2, incluso se determino que no tiene algún efecto en la producción de ROS, caso contrario al reportado en hemocitos de *Mytilus* en cultivo primario responde a un estímulo con IL-2 incrementando la expresión de membrana (Cao *et al.*, 2003) y el aumento en la producción de especies reactivas de nitrógeno (Novas *et al.*, 2004).

Debido al repertorio celular limitado que poseen los invertebrados (Bauchau 1981, Söderhäll, 2010) los hemocitos deben desempeñar un mayor número de funciones para subsanar la falta de repertorio celular con funciones específicas; esto nos plantea la posibilidad de suponer 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 la translocación del contenido hacia la membrana, aumentando la densidad de proteínas, y con ello potenciando el reconocimiento o la activación celular. Algunos investigadores han propuesto medir funciones identificadas y establecidas en mamíferos que se pudieran determinar en un modelo de invertebrado, como la proliferación celular. En hemocitos se realizó una estimulación por adición de interleucina 2 y/o fitohemaglutinina P en cultivos primarios de *Styela clava* (Raftos *et al.*, 1991) midiendo un efecto de proliferación, otros lo han relacionado a distintos mecanismo de defensa y algunos mas en la reducción de la expresión de CD25 (Cao *et al.*, 2004).

Un paso importante para el entendimiento de los mecanismos celulares y humorales de los crustáceos, es la caracterización de las proteínas, algunas de estas proteínas se ha sugerido que presentan ciertas secuencias que posiblemente estén conservadas a lo largo de la evolución. Algunas de estas proteínas desarrollan funciones muy similares por que están asociadas a procesos de metabolismo, mientras que en un carácter inmunológico la homología es difícilmente comparable.

En el ámbito inmune de comunicación celular se han descrito citocinas como el con actividad semejante a IL-1 de mamíferos en el plasma de *Asterias forbesi* (Beck *et al.*, 1988), también Raftos y colaboradores (1991) separaron las isoformas de la fracción con actividad similar a IL-1 de *A. forbesi*, determinando que solo una de las 3 isoformas tiene actividad a IL-1.

Existen pocos reportes sobre identificación o función de proteínas encontradas de vertebrados en invertebrados, en nuestros resultados sobre la caracterización de epitopes similares a CD25, encontramos que la proteína reconocida tiene un tamaño menor al ya reportado en vertebrados, mientras que su presencia es visible en el lisado celular. Mientras que separando por isoelectroenfoque se determinó que el contenido proteico es entre 200 y 21 kDa y los puntos isoeléctricos se encuentran en su mayoría en un rango de pH entre 5 y 10. La proteína reconocida está constituida por 2 isoformas de tamaño similar alrededor de 21 kDa y 23 kDa, con puntos isoeléctricos cercanos entre 8 y 9 al ser los únicos puntos reconocidos, esto nos permite plantear que la proteína reconocida pudiera tener una asociación mayor a los 23 kDa identificados en su forma desnaturalizada y que en su estado nativo podría presentar formas más complejas de asociación como dímeros. Esta es una posibilidad ya que muchos de los receptores de citocinas de vertebrados están constituidos de varias subunidades. Cuando se asocian desencadenan mecanismos efectores.

Al determinar la posible homología con algún tipo de secuencia en bases de datos, nos indicó que existe una semejanza del 27% (Tabla 1) con el inhibidor del receptor de interleucina 1A (IL-1RA) la cual es una glicoproteína (Dinarello, 2010), asociada a mecanismos de regulación negativa de la proinflamación y daño a tejido. Además de tener sitios potenciales de glicosilación lo que nos plantea la posibilidad de que las modificaciones afectarían la función de la proteína identificadas similares a CD25, los procesos de glicosilación a las proteínas trae consigo la formación de glicoproteínas; este proceso es mediado por enzimas, las modificaciones le confieren estabilidad, también participan en la carga neta de la proteína lo cual establecería su estabilidad en un pH básico como en los gránulos de los hemocitos, le confieren resistencia a la proteólisis que podría ser importante teniendo en cuenta que varios de los procesos proteolíticos ocurren a partir del contenido de los gránulos; y su afinidad en los procesos de reconocimiento celular, como adhesión, señalización, bloqueo e internalización, procesos los cuales podrían llevarse a cabo

en un nivel de hematopoyesis en la cual la diferenciación celular aunque no se ha establecido plenamente estos procesos (Leibiger *et al.*, 1998; Yarema and Bertozzi, 2001)

Es interesante saber que la secuencia que presenta nuestra proteína identificada tiene baja similitud con una citocina de vertebrados, si analizamos la homología de las citocinas en vertebrados observamos que tienen poca similitud, la IL-1 α y la IL-1 β humana son fragmentos de 17 kDa originados a partir de proteínas precursoras inactivas, de unos 30 kDa, llamadas pro-IL-1 α y pro-IL-1 β , entre ellas presentan una similitud del 26%, mientras que comparadas contra IL-1Ra, la homología es del 19%, todas tienen en común el reconocimiento de un mismo receptor (IL-1R) aunque con efectos contrarios (Garlanda *et al* 2013).

Existen reportes de una molécula purificada de *Styelid clava* (tunIL-1) ésta, tiene un efecto similar a IL-1 pero al bloquear la actividad con anticuerpos contra el receptor de IL-1, solo bloquea la actividad de IL-1 y no la de tunIL-1 sugiriendo que tiene receptores distintos y la actividad que desencadenan es similar (Raftos, 1996). De forma similar, Beck *et al* (2000) reportan la proliferación de coelomocitos por acción de IL-1 recombinante de humano, en *A. forbesi*, así mismo purificaron una IL-1-like (Beck *et al.*, 1991) donde las funciones son similares en los coelomocitos, al utilizar anticuerpos contra el receptor de IL-1 recombinante humano se bloquea la actividad de ambas moléculas, con lo que identifican un receptor compartido para IL-1 e IL-1-like. En ambos casos se determinó una activación estableciendo parámetros basados en la similitud entre moléculas no determina la actividad o función a desempeñar inherente a ella, los mecanismos de defensa que han estudiado hemocitos, como la producción de ROS, fagocitosis, desgranulación entre otros, nos permite sugerir que el efecto en la generación de especies reactivas de oxígeno, sobre las proteínas identificadas después de una activación de hemocitos con PMA el cual se ha reportado que activa la generación de ROS (Sanchez *et al.*, 2014), al determinar la inmunolocalización de CD25 se registró un aumento (++) en la marca sobre los hemocitos positivos a éste, al compararlo con el basal (+), generando cambios en la expresión de la proteína similar a CD25, lo que ocasionó cambios morfológicos a nivel de citoesqueleto, reduciendo las extensiones ocasionadas por el proceso de adhesión al interactuar el hemocitos con la superficie, formando lamelopodios y filopodios, afecto, en su mayoría a los hemocitos que presentan gránulos. Al estimular con PMA e inhibir con DPI la marca disminuyó de manera sustancial (+/-) comparado con el basal (Figura 11) y la modificación

del citoesqueleto se desarrolló de manera contraria, aumentando la extensión de las células, definiendo más la formación de filopodios de forma polarizada, mientras que de manera basal los filopodios se desarrollan en la periferia de la célula. En ambos procesos la viabilidad fue mayor al 85%. Cuando se realiza un Western-blot revelando con antiCD25-Px de lisados celulares, se reconoce una banda de 23 kDa de manera basal, mientras que en las células activadas con PMA se incrementa la intensidad de la marca en la banda de 23 kDa y se identifica una banda alrededor de 54 kDa, al revelar los lisados celulares de las células activadas e inhibidas en la generación de ROS, la marca de la banda de 23 kDa disminuye, comparando con el basal y se pierde completamente el reconocimiento por la banda de 54 kDa (Figura 9). Este resultado concuerda de manera pareada a la inmunolocalización que presentan las proteínas reconocidas.

Se saben las funciones que desempeñan los mecanismos de defensa al tener contacto con algún agente extraño, la selectividad que tienen las células circulantes para discriminar entre lo propio de lo extraño, aun después del reconocimiento poder actuar de una manera específica y posteriormente regular este tipo de mecanismos de defensa, nos hace suponer que las vías de señalización que podrían desencadenar es mas compleja de lo que se conoce en realidad. La transducción de estas señales implica la unión de ligandos moleculares a receptores de superficie que desencadenan eventos dentro de la célula. La transducción de señales ha sido estudiada en insectos, donde se ha encontrado homología con algunas vías de vertebrados y se han propuesto otras, en camarones se ha reportado algunas que comparten similitud como la vía por receptores tipo Toll, IMD, JAK/STAT (Lemaitre *et al.*, 2007).

La caracterización de moléculas participes para dilucidar las vías de señalización, nos permite asociar los mecanismos estudiados y reportados en distintas especies. En nuestro modelo de estudio se selecciono un activador, el PMA, ocasiona la producción de ROS (Takeya *et al.*, 2003), afectando la inmunolocalización de nuestra proteína identificada. Cuando se genera estallido respiratorio, aumenta la marca y difusión de ésta, la posible relación que tenga la generación de ROS es que son producto de la NADPH oxidasa que se forma a partir de un proceso de fosforilación generado por PKC sobre varios de sus componentes como p47^{phox} y p67^{phox}, reclutando otras moléculas como Rac, p40^{phox} y NOX2 (Coyoy y Morán 2012) que forman un complejo el cual genera ROS, estos radicales no solo se activan para un mecanismo de defensa, que se ha conservado entre vertebrados e

invertebrados, si no que se ha descrito que regula mecanismos como señalización por receptores de estrés activando distintos factores nucleares (NF- κ B), otra forma de que estos radicales actúan es en forma de H_2O_2 el cual es permeable y afecta la actina, la cual despolimerizan afectando procesos como la migración (Miller *et al.*, 2010) y la generación de lamelopodios, filopodios y la quimiotaxis (Sakai *et al.*, 2013). Es posible que los radicales afecten la presencia de la proteína reconocida y aumente su presencia por algún señal o por la subsecuente estimulación de PKC; para ver que es lo que generaba el cambio en la marca se inhibió la generación de especies reactivas. Cuando se realiza la activación con PMA ésta activa PKC y ocasiona la formación de NADPH oxidasa pero al adicionar DPI, un inhibidor específico de una subunidad de NOX2 (gp91^{phox}), evita el transporte de electrones para formar los radicales. La falta de los radicales, por la inhibición, ocasiona que la señal en la inmunohistoquímica (Figura 12) se vea reducida, con lo que podemos plantear que la formación de especies reactivas están afectando la presencia y expresión de la proteína reconocida, mientras que al faltar los radicales la actina y otros procesos involucrados no son afectados, resultando en la formación de filopodios bien definidos y evitando la despolimerización de la actina por acción de ROS (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Lassing *et al.*, 2007). La utilización de otros inhibidores para las diferentes formas de PKC y la determinación de las señales asociadas a su activación nos permitiría confirmar si las especies reactivas son las únicas que afectan a la presencia de las proteínas reconocidas y que modifica el reconocimiento de estas.

Las proteínas identificadas en nuestro estudio no pueden ser asociadas completamente a su función o similitud con las proteínas de vertebrados, ya que los anticuerpos reconocen en un epítipo de una secuencia, aunque posiblemente este conservada, en vertebrados existe mayor complejidad, queda entonces la posibilidad de que las proteínas de invertebrados sean precursores de vertebrados, pero se debe investigar la forma en que se dio este evento, ya sea a nivel genético se modificó el gen para dar un nuevo producto o fue a nivel de la proteína, por cambios postraduccionales como la glicosilación (Curtis, 2001), esto siguiendo las bases de 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, o la duplicación “en bloque” de genes donde se conserva un gen funcional y con el pasar del tiempo, se modifica para nuevas funciones, puede ir perdiendo la similitud

secuencial aunque quizá no la funcional., es posible que algo así pasara con el marcador CD25, receptor característico de células de la inmunidad adaptativa, especialmente importantes en la respuesta inmunitaria en humanos, de modo que 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 y Malek 2001), esto implicaría alguna limitante para producirla o, por la eficiencia con la que actúa nos permite inferir que es energéticamente benéfico para las células linfocíticas reciclar proteínas, 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; 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 prolongados y determinar su reacción al estimularlos con diferentes moléculas que se relacionen o activadores policlonales, como su propia lectina (CqL) e IL-1 y estudiar los efectos que provoquen, como la proliferación y determinar su localización, expresión o sus efectos en los mecanismos de defensa, así como inhibidores que nos ayuden a dilucidar algunas de las rutas que podrían estar participando en la señalización.

CONCLUSIONES:

En hemocitos de *Cherax quadricarinatus* se determinó la presencia de 3 tipos de hemocitos las células hialinas, granulares y semigranulares de las cuales 2 presentan epítomos similares a CD25. Se encuentra localizado en los gránulos, tiene un tamaño alrededor de 23 kDa, esta constituida por 2 subunidades de 21 y 23 kDa con un punto isoeléctrico entre 8-9 con un carácter básico de los gránulos, no tienen isoformas, tiene una homología con IL-1Ra. Su presencia se ve afectada en la producción de radicales de oxígeno junto con la modificación del citoesqueleto, carece de receptores para IL-2.

PERSPECTIVAS

- Immunolocalizar CD25 en hemocitos de *C. quadricarinatus* y en tejido hematopoyético por microscopia electrónica.
- Immunolocalizar CD25 por estímulo de otros activadores como LPS, PMA, β -glucanos e IL-1.
- Determinar proliferación en presencia de IL-1 en tejido hematopoyético.
- Obtener de la hemolinfa proteínas de tamaño similar a citocinas y determinar su actividad semejante a IL-1.
- Comprobar la reorganización del citoesqueleto (F-actina, G-actina, Rac, Rho) tras un estímulo.

LITERATURA CITADA:

- Abbas K, Lichtman A, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular. España. 7 ed.
- Adema, E.C. van Deutekom-Mulder, W.P.W. van der Knaap. 1994. Schistosomicidal activities of *Lymnea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitology*. 109: 479–485.
- Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 17:593-623.
- Agundis C, Pereyra A, Zenteno R, Brassar C, Sierra C, Vazquez L, Zenteno E. 2000. Quantification of lectin in freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hemolymph by ELISA. *Comp Biochem P*. 127: 165-172.
- Angraeni T, Ratcliffe NA. 1991. Studies on cell-cell cooperation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol*. 37:453–460.
- 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.
- Aspan 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.
- 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.
- Bauchau AG, Ratcliffe NA, Rowley AF. 1981. *Invertebrate Blood Cells*. 55: 385-420.
- Bell, Smith. 1993. In vitro superoxide production by hyaline cells of the shore crab *Carcinus maenas*. *Dev. Comp. Immunol*. 17: 211–219.

Betti M, Ciacci C, Lorusso LC, Canonico B, Falcioni T, Gallo G, Canesi L. 2006 Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on *Mytilus* hemocytes: role of stress-activated MAP kinases. *Biol Cell* 98: 233-244.

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.

Callahan, R.K. Crouch, E.R. James. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today*, 4: 218–225.

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

Chaga O, Lignell M, Söderhäll K. 1995 The haemopoietic cell of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Anim Biol.* 4:57-70.

Chanock, S.J. El Benna, R.M. Smith, B.M. Babior. 1994. The respiratory burst oxidase *J. Biol. Chem.* 269: 24519–24522

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

Cooper D. Max, Alder N. Matthew 2006. The evolution of adaptative immune system. *Cell* 124: 815–822.

Crozatier M, Meister M. 2007. *Drosophila* hematopoiesis. *Cell Microbiol* 5:1117-11126.

Destoumieux D, Muñoz P, Bulet P, Bachere E. 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp. *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.

- Dinarello CA. 2010. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell*. 140:935–950.
- Dodd RB, Drickamer K, 2001. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology* 11,71R–79R.
- Du Pasquier. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 129(1):1-15.
- 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.
- Elrod-Erickson M, Mishra S, Schneider D., 2000. Interaction between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol*. 10, 781–7
- Flandre O, 1972. The culture of molluscan cell, in: *Invertebrate tissue culture* Academic Press, New York and London. Vol 1:361-383.
- Ferrandon D, Imler JL, Hetru, C., Hoffmann, J.A., 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signaling during bacterial and fungal infections. *Nature Rev Immunol*. 7:862–874.
- Fuller- Espie SL. 2010. Vertebrate cytokines interleukin 12 and gamma interferon, but not interleukin 10, enhance phagocytosis in the annelid *Eisenia hortensis*. *J Invertebr Pathol*. 104(2):119-24
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol*. 42:611–643.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the atlantic white shrimp, *L. setiferus*. *Dev Com Immunol*. 25: 565–577.
- Haldane, JBS. 1949. Disease and evolution. *The Ricer Scientific* 19 (suppl), 68–75.
- 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.

- Hoekstra HE, Coyne JA. 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.
- Hui Y, Jianchuan W, Jiamu D, Chen Z, Dapeng Z, Huaizu G, Yajun G and Jianping D. 2010. Structural basis of immunosuppression by the therapeutic antibody daclizumab. *Cell Research*. 20:1361–137.
- Iwanaga S, Miyata T, Tokunaga F, Muta T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. *Thrombosis Res*. 68, 1–32
- Iwanaga S, Lee BL. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol*. 38: 128–150.
- J Du, 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, Sritunyaluksana K. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191: 45-52.
- Johnson, PT. 1980 *Histology of the blue crab, Callinectes sapidus: A model for the decapoda*. New York. Praeger 440.
- 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. *Invertebrate Immunology*. Fair Haven, CT: SOS; 255–283.
- Kilpatrick DC. 2002. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta*. 1572:187–197.
- Kindt JT, Goldsby A R, Osborne AB. 2007. *Inmunologia de Kuby*. México. 6 Ed
- 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.
- Lassing I, Schmitzberger F, Björnstedt M, Holmgren A, Nordlund P, Schutt CE, Lindberg U. 2007. Molecular and structural basis for redox regulation of beta-actin. *J Mol Biol*. 370: 331-48.
- 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 β -1,3-glucan binding protein from hemocytes of freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem*. 275: 1337–1343.

Leibiger I E, Leibiger B, Moede I and Berggren. 1998. Exocytosis of insulin promotes insulin gene transcription via the insulin receptor /PI-3 kinase/p70S6 kinase and CaM pathways. *J Cell Biol*. 163(6): 1327–1337

Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 2007;25:697e743.

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* 86: 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.

Malagoli D, Sacchi S, Ottaviani E. 2008. Unpaired (*upd*)-3 expression and other immune-related functions are stimulated by interleukin-8 in *Drosophila melanogaster* SL2 cell line. *Cytokine*. 44(2):269-274.

Marques MRF, Barracco MA. 2000. Lectins as non-self recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* 191: 23–44.

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

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.

Muta T., Seki N., Takaki Y., Hashimoto R., Oda T., Iwanaga A., Tokunaga F., Iwanaga S., 1995. Purified horseshoe crab factor G. Reconstitution and characterization of the (1-3)-beta-D-glucan-sensitive serine protease cascade. *J Biol Chem*. 270, 892–897.

Mu Y¹, Lan JF, Zhang XW, Wang XW, Zhao XF, Wang JX. 2012. A vector that expresses VP28 of WSSV can protect red swamp crayfish from white spot disease. *Dev Comp Immunol*. 36(2):442-9.

Nagai, T., Kawabata, S., 2000. A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J Biol Chem*. 275: 29264–29367.

Nagai, T., Osaki, T., Kawabata, S., 2001. Functional conservation of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem*. 276, 27166–27170.

Nappi et al., A.J. Nappi, E. Vass, F. Frey, Y. 1995. Carton Superoxide generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites *Eur. J. Cell Biol.*,68:450–456.

Nappi, A.J., Vass, E., Frey, F., Carton, Y., 2000. Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide*, 4, 423–430.

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.

Pancer Z, Cooper D. 2006. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*. 24:497–518

Paul WE. 2003. *Fundamental Immunology*. 5 Ed. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA. pp 550-551.

Pearson AM, Baksa K, Rämets M, Protas M, McKee M, Brown D, Ezekowitz RA, 2003. Identification of cytoskeletal regulatory proteins required for efficient phagocytosis in *Drosophila*. *Microbes Infect.* 5:815–824.

Peebles J, 1977. A rapid technique for molt staging in live *Macrobachium 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.

Rämets M., Manfrulli P., Pearson A., Mathey-Prevot B., Ezekowitz R.A., 2002. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 461:644–648.

Raftos D, 1996. Interaction of tunicate immunomodulatory proteins with mammalian cells. *Inmunol Cell Biol.* 74:26-31.

Raftos DA, Stillman DL, Cooper EL. 1991. Interleukin-2 phytohaemagglutinin stimulated the proliferation of tunicate cells. *Inmunol 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.

Roitt I, Brostoff J, Male D. 2003. *Inmunologia* 5a Ed. Mexico. 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.

Jiro Sakai, Jingyu Li, Kulandayan K. Subramanian, Subhanjan Mondal, Besnik Bajrami, Hidenori Hattori, Yonghui Jia, Bryan C. Dickinson, Jia Zhong, Keqiang Ye, Christopher J Chang, Ye-Shih Ho, Jun Zhou, and Hongbo R. Luo. 2013. Reactive oxygen species (ROS)-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils. Immunity . 37 (6):1037-1049.

Sánchez Salgado JL. Pereyra M.A. Vivanco Rojas O. Sierra Castillo C. Alpuche Osorno J.J. Zenteno E. Agundis C. 2014. Characterization of a lectin from the crayfish *Cherax quadricarinatus* hemolymph and its effect on hemocytes. Fish Shellfish Immunol 39:450-457.

Shockey JE, O’Leary NA, de la Vega E, Browdy CL, Baatz JE, Gross PS. 2009. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: an in vivo approach. Dev Comp Immunol 33 (5), 668–673.

Sierra, R. Lascurain, A. Pereyra, J. Guevara, G. Martinez, C. Agundis. 2005. Participation of serum and membrane lectins on the oxidative burst regulation in *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes. Dev Comp Immunol, 29:113–121.

Smith VJ, Söderhäll K, 1983a. Induction and degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. Cell Tissue Res. 233:295–303.

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. 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., 2009 Invertebrate Immunology. Fair Haven, USA. 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.* 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.

Supungul P, Tang S, Maneeruttanarungroj C, Rimphanitchayakit V, Hirono I, Aoki, T., 2008. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustin Pm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol* 32 (1): 61–70.

Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H. 2003. Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: 25234–25246.

Tan NS, Ho B, Ding JL, 2000. High-affinity LPS binding domain(s) in recombinant factor C of a horseshoe crab neutralizes LPS-induced lethality. *FASEB J.*14: 859–870.

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 (*Parachaeeraps bicaritus*). *Aust J Exp Biol Med Sci.* 52: 341–348.

Van de Braak CB, Botterblom MH, Liu W. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Panaeus monodon*) *Fish Shellfish Immunol.* 12:253-272.

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. 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.

Vivier E, Malissen B. 2005. Innate and adaptive immunology: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunol*. 6: 17-21.

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.

Wheatly G. M y Ayers Jane. 1995. Scaling of calcium, inorganic contents and organic contents to body mass during the molting cycle of the fresh-water crayfish *Procambarus clarkii*. *J Crustaceans Biol*. 15: 409-417.

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.

Wu CL, Söderhäll I, Kim YA, Söderhäll K. 2008. Hemocyte-lineage marker proteins in a crustacean, the freshwater crayfish, *Pacifastacus liniusculus*. *Proteomics*. 8:4226-4235.

Yarema KJ, Bertozzi CR. 2001. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biology* 2(5):1

Yu A, Malek TR. 2001. The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2. *J Biol Chem*. 276: 381–385.

Zeng D, Chen X, Xie D, Zhao Y, Yang C, Li Y, Ma N, Peng M, Yang Q, Liao Z, Wang H, ChenX. 2013. Transcriptome Analysis of pacific white shrimp

(*Litopenaeus vannamei*) Hepatopancreas in Response to taura syndrome Virus (TSV) Experimental Infection. PLoS ONE 8(2): e57515.

Zenteno R¹, Vazquez L, Sierra C, Pereyra A, Slomianny MC, Bouquelet S, Zenteno E. 2000. Chemical characterization of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by Maldi-Tof. Comp Biochem Physiol. 127: 243–250.