

00361

33
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION
QUIMICA DE LA LECTINA PRESENTE EN LA
HEMOLINFA DE MACROBRACHIUM ROSENBERGII
(DEMAN), (CRUSTACEA: DECAPODA).

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

MARIA MARGARITA LORENA VAZQUEZ NAVARRETE



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION QUIMICA DE LA
LECTINA PRESENTE EN LA HEMOLINFA DE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*
(DE MAN), (CRUSTACEA: DECAPODA).

CONTENIDO

INDICE	v
TABLA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	1
INTRODUCCION Y OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	16
MATERIAL Y METODOS	22
RESULTADOS	40
DISCUSION	60
CONCLUSIONES	69
LITERATURA CITADA	71

INDICE

TABLA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	4
II. ASPECTOS GENERALES DE LAS LECTINAS EN LOS INVERTEBRADOS.	
- PROPIEDADES BIOLÓGICAS	7
- SINTESIS DE LA LECTINA	9
- MECANISMO DE RECONOCIMIENTO ENTRE LO PROPIO Y LO NO-PROPIO.	11
- ESPECIFICIDAD DE LAS LECTINAS POR CARBOHIDRATOS	13
III. ANTECEDENTES	16
IV. MATERIAL Y METODOS	22
- OBTENCION Y TRATAMIENTO DE LA HEMOLINFA	22
- ACTIVIDAD AGLUTINANTE	23
- PURIFICACION DE LA LECTINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD	25
a). Fetuína-Sepharosa 4-B	25
b). Estroma-Sephadex G-25	26
- DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA	27

- CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS	28
- COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS	28
- COMPOSICION DE AMINOACIDOS	29
- ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR Y COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	29
a). Cromatografía de filtración	30
b). Ultracentrifugación	30
- PUNTO ISOELECTRICO	31
- ESPECTRO DE ABSORBANCIA	32
- ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS	33
- EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE	35
- DEPENDENCIA A METALES	36
- OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-HEMOLINFA	37
- INMUNDIFUSION	37
- INMUDELECTROFORESIS	38
V. RESULTADOS	40
VI. DISCUSION	60
VII. CONCLUSIONES	69
VIII. LITERATURA CITADA	71

TABLA DE ABREVIATURAS

Da	=	Daltons
D.O	=	Densidad óptica
KDa	=	Kilodaltones
mÅ	=	mili angstroms
mM	=	milimolar
M	=	molar
Mol	=	moléculas
nm	=	nanómetros
NR	=	material no retenido
pI	=	punto isoeléctrico
R	=	material retenido (lectina purificada)
residuos/mol	=	residuos por molécula
rpm	=	revoluciones por minuto
S _{20,v}	=	Coefficiente de sedimentación
UHA	=	Unidades hemaglutinantes

RESUMEN.

En los animales vertebrados se ha establecido que el reconocimiento de lo no-propio por el organismo está mediado por la presencia de proteínas específicas del suero, denominadas Inmunoglobulinas. En la mayoría de los invertebrados se considera que dicho mecanismo de reconocimiento está relacionado con las proteínas conocidas como lectinas, las cuales se ha propuesto que llevan a cabo algunas funciones análogas a la de los anticuerpos.

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de reconocer e interactuar con estructuras que presentan carbohidratos, y se pueden encontrar libres o en la membrana de las células, uniéndolo partículas no-propias a la superficie de hemocitos de invertebrados favoreciendo la fagocitosis.

Considerando la probable importancia que presentan las lectinas en el mecanismo de defensa de los invertebrados, en el presente estudio se plantearon como objetivos: el aislar, purificar y caracterizar químicamente la lectina del suero del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), así como determinar su especificidad por carbohidratos, esto con la finalidad de determinar si realmente existe la participación de

esta proteína en el proceso de reconocimiento celular entre lo propio y lo no-propio en la especie de importancia económica *M. rosenbergii* (De Man).

La lectina fue aislada de organismos adultos machos y hembras del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), obtenidos del Centro Piscícola El Jicarero, en el estado de Morelos. El proceso de purificación de la lectina se llevó a cabo por cromatografía de afinidad utilizando fetuina acoplada a Sepharosa 4-B. El peso molecular determinado por cromatografía de filtración indica que se trata de una glicoproteína de aproximadamente 14 KDa, con un coeficiente de sedimentación de 1.4 y punto isoelectrico entre un pH de 5.4 y 6.1; la lectina está compuesta principalmente por glicina, serina, glutámico y aspártico; la porción glicánica contiene ácido siálico, galactosa, manosa y N-acetil-D-glucosamina. La lectina aglutina únicamente eritrocitos de rata y conejo; dicha actividad es inhibida específicamente por los azúcares N-acetilados: N-sialil lactosa (α -2,6) y N-acetil-D-lactosamina (β -1,4), el glicósido α -D-galactosamina-1-fosfato, y por las glicoproteínas: fetuina, mucina de la glándula submaxilar bovina, así como por las glicoproteínas obtenidas de la membrana de los eritrocitos de rata. El hecho de que la lectina de *M. rosenbergii* (De Man), reconozca principalmente eritrocitos de rata y conejo los cuales tienen un alto contenido de ácido O-acetil siálico, y dicha actividad sea inhibida por estructuras que poseen ácido siálico,

nos permite suponer que éste carbohidrato forma parte importante del receptor para la lectina. Esta hemaglutinina no es dependiente de Ca^{++} y Mg^{++} , y se comporta estable a una temperatura menor de 50°C .

AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION QUIMICA DE LA LECTINA PRESENTE EN LA HEMOLINFA DE *MACROBRACHIUM ROSENBERGII* (DE MAN) (CRUSTACEA: DECAPODA).

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

El grupo de los invertebrados comprende una gran diversidad de especies animales, y por lo tanto una considerable variación en el potencial inmune, en particular la inmunidad de los artrópodos puede estar representada por un mecanismo de respuesta de tipo celular como es la fagocitosis, el sistema de la profenoloxidasa, formación de nódulos, encapsulación melanótica y la citotoxicidad; o bien por una respuesta de tipo humoral, en la que participan ciertos factores como las lectinas con la función específica de reconocimiento de lo no-propio, y algunos bactericidas como las lisozimas, cecropinas y atacinas los cuales, se ha propuesto que pueden ser activados de manera específica e inespecífica (1, 2).

Las lectinas comprende al grupo de proteínas que tienen la capacidad de reconocer y unir específicamente estructuras de

carbohidratos, por esta razón las lectinas precipitan glicoconjugados en solución o aglutinan células y eritrocitos, por lo que se les ha denominado también hemaglutininas (3). En los invertebrados estas proteínas se han detectado libres en el plasma y/o asociadas a la membrana de hemocitos (4).

La presencia de las lectinas en la hemolinfa de los crustáceos actualmente es tema de interés en el área de la patología de invertebrados, aunque la función de las lectinas en diversas especies de invertebrados aún no ha sido determinada claramente, se sugiere que estas proteínas están presentes sobre la membrana de hemocitos y funcionan como receptores, participando en el reconocimiento y enlace de partículas extrañas, favoreciendo la ingestión por los fagocitos (4). Se ha propuesto también que la presencia de lectinas con diferente especificidad por carbohidratos, aisladas ya sea entre especies diferentes o individuos (por ejemplo de órganos sexuales, huevecillos o hemolinfa), pueden presentar diversas actividades biológicas como es el reconocimiento entre lo propio y no-propio, el incremento de la fagocitosis o la regulación metabólica (5, 6, 7).

Actualmente se cuenta con varios reportes sobre la presencia de aglutininas en diversas especies de los invertebrados (8). En particular para el grupo de los crustáceos decápodos se ha detectado la presencia de lectinas en 18 especies, de las cuales

solo cinco de éstas se han caracterizado químicamente y determinado su especificidad. Considerando la importancia que posiblemente presentan las lectinas en el mecanismo de defensa (para prevenir o manipular la resistencia a enfermedades), o bien su participación en los procesos de regulación metabólica, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Aislar la hemaglutinina presente en la hemolinfa del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man).
2. Purificar la lectina presente en el suero de *M. rosenbergii* (D.).
3. Caracterizar químicamente y conocer algunas propiedades físico-químicas de la lectina del langostino.
4. Determinar la especificidad de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) por estructuras de carbohidratos.

Esto con la finalidad de conocer las características químicas y físicas de la proteína que probablemente participa en el mecanismo de defensa en el langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.).

II. ASPECTOS GENERALES DE LAS LECTINAS EN LOS INVERTEBRADOS

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS HEMAGLUTININAS EN INVERTEBRADOS.

Si bien, la función de las lectinas en los crustáceos no está claramente determinada, la presencia de las lectinas en el suero y en la superficie de los hemocitos permite suponer que las lectinas participan en la eliminación de patógenos.

En la langosta americana *Homarus americanus* H. Milne, se han llevado a cabo ensayos de reconocimiento hacia lo no-propio, y se ha sugerido que las bacterias son reconocidas por factores presentes en la hemolinfa o sobre la membrana de células fagocíticas, como en el caso particular de la aglutinación de la bacteria patógena *Gaffkya homari* por la hemolinfa de esta especie (9, 10). En el cangrejo australiano *Parachaeraps bicarinatus* se demostró que la resistencia a la infección por la bacteria *Pseudomonas* sp. se puede incrementar si el organismo es previamente vacunado con bacterias Gram negativas o endotoxinas, lo cual sugiere que se provoque un aumento en la actividad de las células fagocíticas, tal propuesta podría ser corroborada al comparar la actividad fagocítica *in vitro* de hemocitos del cangrejo *P. bicarinatus* normales e inmunizados (11). También se ha observado que las lectinas del mejillón azul *Mytilus edulis* Linné, y de la oreja de mar *Aplysia californica* Cooper,

participan en la fagocitosis, actuando de manera similar a un anticuerpo, debido a la capacidad que tienen las lectinas de funcionar como receptores de membrana enlazando virus, bacterias, hongos u otro tipo de parásitos que están en contacto con la hemolinfa (12, 13). Otros trabajos indican que la presencia de la lectina en el suero del crustáceo *Parachaeraps bicarinatus* determina la fagocitosis de eritrocitos de carnero, sugiriendo que la especificidad de la hemaglutinina está relacionada con la actividad opsonizante del suero, lo cual también se ha reportado para el cangrejo del arrecife *Ozius truncatus* (4), incluso se ha observado que la actividad aglutinante de la lectina purificada de la pupa del gusano de seda del roble *Antheraea pernyi* (Guérin-Méreville), se incrementa al inocular al organismo con bacterias de *Escherichia coli* (14). Estas son evidencias de que las lectinas actúan como factor humoral facilitando el reconocimiento de lo no-propio y dando lugar a una fagocitosis más eficiente (15, 16).

Se ha observado que las lectinas también participan en el transporte y almacenamiento de calcio y de azúcares para el crecimiento del esqueleto en moluscos, lo cual se sugiere por la capacidad que tienen éstas proteínas para organizar moléculas o complejos moleculares facilitando el paso de señales a través de la membrana (17, 18). Otros investigadores proponen que la lectina del camarón araña o centollo europeo *Maja squinado* (Herbst) participa en la regulación de la metamorfosis ya que

disminuye su concentración y llega a desaparecer durante la muda (19).

Con respecto a la presencia de lectinas en relación al sexo y a las diferentes etapas de desarrollo en los organismos, se ha reportado que existe una actividad aglutinante significativamente más alta en el suero de individuos machos del cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathbun, en comparación con las hembras (20). De igual manera, se ha asociado también la presencia de lectina con las diferentes etapas de desarrollo de los organismos por ejemplo, se ha observado que existe una concentración de hemaglutinina más elevada en los organismos adultos del cangrejo coco *Birgus latro* (Linnaeus), con un peso de 628 g que en los individuos jóvenes con un peso menor de 400 g (21).

SINTESIS DE LAS LECTINAS.

Pocos estudios se han enfocado hacia el conocimiento de los sitios en los cuales se originan y sintetizan las lectinas en los artrópodos. En investigaciones, utilizando anticuerpos anti-lectina acoplados a fluorosceína, se ha logrado detectar la presencia de dos tipos de lectinas en la superficie de hemocitos de la cucaracha de la madera *Leucophaea maderae* (Fabricius); logrando marcar a los hemocitos cultivados *in vitro*, demostrando así la presencia de hemaglutininas sobre la membrana plasmática,

en el citoplasma y en las vacuolas en dos de los cuatro tipos de células presentes en ésta especie; de manera interesante se observó que tales hemocitos al ser tratados con cicloheximida no se identificaron con los anticuerpos anti-lectina, sin embargo, los hemocitos pueden ser identificados nuevamente por los anticuerpos anti-lectina, cuando los hemocitos son incubados sin cicloheximida por un tiempo de 24 hrs, por lo cual se sugiere que las hemaglutininas son sintetizadas en los hemocitos (22, 23).

En el gusano de seda *Hyalophora cecropia* (Linnaeus), se ha logrado inducir la síntesis y secreción de lectina a partir de hemocitos cultivados *in vitro* no así de adipohemocitos (24), sin embargo, en la mosca de la carne *Sarcophaga* sp. Akihiro y Natori (25) han logrado inducir lectina a partir de estas células; por estudios inmunocitoquímicos en *H. cecropia* (Linnaeus) se ha observado la presencia de lectina particularmente en los gránulos y superficie de plasmátocitos, en células que se encuentran en contacto con la hemolinfa y en células indiferenciadas precursoras de hemocitos, lo que confirma, que los hemocitos son el lugar de síntesis y probablemente también sitio de función para las lectinas (24).

En el crustáceo *Squilla mantis* (Linnaeus), también se ha logrado demostrar la presencia de lectina sobre la membrana de los hemocitos por medio de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-lectina, lo que sugiere que también en ésta especie la lectina podría ser sintetizada en los hemocitos (26).

MECANISMO DE RECONOCIMIENTO ENTRE LO PROPIO Y LO NO-PROPIO.

Como factor humoral en los invertebrados, las lectinas han llamado la atención por tener la habilidad de aglutinar eritrocitos de vertebrados o bacterias *in vitro* aunque, su papel *in vivo* aun se desconoce (24).

Tanto la especificidad como el título de actividad aglutinante de las lectinas se ha observado que varía entre las especies diferentes de los invertebrados en las cuales, se puede presentar especificidad hacia determinada estructura carbohidrato o un amplio rango de especificidad, lo que sugiere que determina la inter-relación entre lo propio y lo no-propio (25), y por lo tanto estas proteínas podrían estar involucradas como moléculas de reconocimiento en el sistema inmune (2).

Pauley (20) y otros investigadores (6, 7), proponen que las especies que presentan lectinas con una especificidad similar por carbohidratos podrían tener una función similar en el sistema inmune. De acuerdo a la hipótesis de Parish (27), la discriminación entre lo propio y no-propio en invertebrados podría estar basada en el reconocimiento de determinantes carbohidratos por oligómeros de glicosil-transferasas solubles o enlazados a la membrana celular. Aunque no se ha observado la secreción de glicosil transferasas en solución, el punto de

importancia se da por la presencia de enzimas con una amplia especificidad, ampliando por lo tanto el rango de reconocimiento posible.

Las lectinas, como un factor de reconocimiento y adhesión para bacterias y eritrocitos se observó en el cangrejo australiano *Parachaeraps bicarinatus*, en ésta especie se sugiere que el reconocimiento de agentes patógenos está en función de la participación de hemaglutininas solubles y factores asociados a la membrana celular del hemocito (28). Burnet (29) apoya esta idea, suponiendo que las hemaglutininas son producidas por los hemocitos, permaneciendo algunas de ellas sobre la superficie celular y otras libres en el sistema circulatorio. Por otra parte, se ha observado que las bacterias pueden ser ingeridas y destruidas por células fagocíticas *in vitro*, independientemente de que las bacterias hayan sido o no pretratadas con hemolinfa (28). Sin embargo, los hemocitos tratados con tripsina no son capaces de ingerir bacterias a menos que las bacterias o hemocitos sean incubados con hemolinfa antes de llevarse a cabo los experimentos. Aún más, hemocitos tripsinados e incubados con hemolinfa no son capaces de fagocitar a las bacterias lo cual, permite concluir que los factores de reconocimiento para bacterias se encuentran libres en la hemolinfa y sobre la membrana de células fagocíticas (28). También se ha propuesto que las lectinas necesitan por lo menos de dos sitios de unión diferentes para facilitar el reconocimiento entre lo propio y

no-propio y poder así reaccionar con la superficie de los hemocitos (3).

ESPECIFICIDAD DE LAS LECTINAS POR CARBOHIDRATOS.

Varios autores están de acuerdo en que las lectinas presentan diferentes funciones dependiendo de las características estructurales que estas poseen, determinando así su presencia en los diferentes órganos de un individuo y la heterogeneidad entre especies diferentes (6, 7, 30). Esto da claras ventajas con respecto a otros factores presentes en la hemolinfa como son los bactericidas ya que estos son mecanismos aparentemente no específicos, siendo por lo tanto las lectinas las que poseen la especificidad para el reconocimiento entre lo propio y lo no-propio (31).

Para identificar la especificidad de las lectinas se han realizado ensayos de inhibición de la actividad aglutinante de eritrocitos de las diferentes especies de vertebrados, utilizando mono y oligosacáridos como inhibidores; mediante estos sencillos experimentos se ha llegado a postular incluso cuales son las secuencias oligosacarídicas presentes en la superficie celular y si el residuo o sacárido que se encuentra en posición terminal es el factor determinante en la interacción de la lectina con el receptor (7).

Entre los principales carbohidratos que se han reportado como inhibidores de lectinas en el grupo de los crustáceos se citan a la N-acetil-D-galactosamina, la N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-acetil-neuramínico (8, 21, 32, 33, 34) (ver Tabla 1); aparentemente no se ha observado inhibición por D-manosa para este grupo (8). Las lectinas que reconocen específicamente al ácido siálico son potencialmente útiles en la detección, localización, purificación y caracterización de glicoconjugados y polisacáridos sialilados (3).

Tabla 1. ESPECIFICIDAD DE LAS LECTINAS POR ESTRUCTURAS CARBOHIDRATO EN EL GRUPO DE LOS DECAPODOS.

ESPECIE	CARBOHIDRATO	REFERENCIA
<i>Birgus latro</i> (L.)	NeuAc	(21)
<i>Callinectes danae</i> S.	NeuAc, GlcNAc; GalNAc, ManNAc, D-Gal.	(8)
<i>Cancer antennarius</i> S.	NeuOAc(9-O-acetil); (4-O-acetil)	(32)
<i>Homarus americanus</i> H.	NeuAc, ManNAc; GlcNAc, D-glc.	(33)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (D.)	sialoglicoconjugados	(34)

NeuAc = ácido N-acetil-neuramínico
 GlcNAc = ácido N-acetil-D-glucosamina
 GalNAc = ácido N-acetil-D-galactosamina
 ManNAc = ácido N-acetil-D-manosamina

D-Gal = D-galactosa
 D-glc = D-glucosa

También se ha observado que la mayoría de las lectinas aisladas de invertebrados son dependientes de Ca^{++} y Mg^{++} , por ejemplo en el grupo de las esponjas se han realizado experimentos sobre el fenómeno de cohesencia y regeneración de células, para lo cual se utilizó agua de mar carente de cationes divalentes y se observó que no ocurre la regeneración, lo que hace proponer que la agregación específica de células está dada por glicoproteínas de superficie de membrana que son dependientes de Ca^{++} y Mg^{++} , y tales iones actúan como ligando específico para las células (35, 36).

Otros experimentos han demostrado que existe una dependencia a iones de calcio por parte de los factores de reconocimiento asociados a la membrana de los hemocitos del mejillón azul *Mytilus edulis* Linné, y tal dependencia se ha observado por el hecho de que el Ca^{++} sólo estimula *in vitro* la fagocitosis de levaduras y eritrocitos (12). También se han detectado lectinas con dependencia a Ca^{++} en el cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathbun, y en la langosta americana *Homarus americanus* H. Milne (20, 37).

III. ANTECEDENTES.

El estudio de las hemaglutininas en los invertebrados y su posible participación en el mecanismo de defensa se iniciaron con los trabajos de Noguchi en 1903 (38), con el quelicerado *Limulus polyphemus* (Linn), en esta especie el Dr. Noguchi realizó ensayos de inmunización y pruebas de aglutinación utilizando la hemolinfa en presencia de eritrocitos de diversas especies de vertebrados; posteriormente en 1912, Cantacuzene (39, 40) observó que en la hemolinfa del cangrejo ermitaño europeo *Eupagurus prideauxii* (actualmente *Pagurus prideauxii* Leach), existen sustancias que tienen una función análoga a la de los "anticuerpos naturales", posteriormente, en 1922 estudió la especificidad de la lectina del sipuncúlido *Sipunculus nudus* hacia eritrocitos de vertebrados por ensayos de actividad aglutinante. Glaser en 1918 (41) realizó ensayos sobre la inmunidad con el saltamontes de patas rojas *Melanoplus femur-rubrum* (De Gree); Roche y Dumazert en 1940 (42) reportaron la presencia de una glicoproteína en buey de mar *Cancer pagurus* (= *Ucides cordatus* (Linnaeus)); en 1945 Tyler y Metz (43) detectaron la presencia de 10 heteroaglutininas en la hemolinfa de la langosta espinosa *Panulirus interruptus* (Randall), posteriormente en 1946 Tyler (5), reporta la presencia de heteroaglutininas en diversas especies de invertebrados

pertenecientes a los grupos: Mollusca (3 Sp.), Anelida (1 Sp.), Echiuroidea (1 Sp.), Echinodermata (5 Sp.) y Urochordata (2 Sp.), obtenidas del fluido seminal y de la hemolinfa.

En particular para el grupo de los decápodos, entre otras especies citadas anteriormente, se encuentran los trabajos de Frenz quien en 1958 (44) detectó una glicoproteína por actividad aglutinante en la hemolinfa del cangrejo natante europeo *Carcinus maenas* (Linnaeus), y a partir de la década de los 60' se encuentra un mayor número de publicaciones enfocadas principalmente a identificar la especificidad de las lectinas por los grupos sanguíneos, su purificación, caracterización química y especificidad por carbohidratos, así como la participación de éstas proteínas en el mecanismo de defensa de los crustáceos. Entre los trabajos se encuentran los de Cushing en 1967 (45), en el reportó la presencia de una hemaglutinina en la hemolinfa del cangrejo ermitaño *Paguristes ulreyi* Schmitt, con especificidad hacia eritrocitos humanos tipo B y O, y determinó la presencia de hemaglutinina en 38 organismos de 88 cangrejos colectados, llegando a la conclusión que la hemaglutinina no está correlacionada con el sexo; Bang, (19) en el mismo año propuso que la lectina del centollo europeo *Maja squinado* (Herbst) participa en la regulación de la metamorfosis, ya que disminuye la concentración de esta proteína durante el tiempo de muda. Cohen en 1968 (21), realizó ensayos de actividad hemaglutinante con la hemaglutinina del suero del cangrejo coco *Birgus latro*

(Linnaeus), la cual presento especificidad hacia eritrocitos humanos tipo A, B y O, y sugiere que existe una posible correlación de la presencia de la hemaglutinina con el ciclo de vida de esta especie; paralelamente Brown y cols. (8), llevaron a cabo estudios sobre la especificidad de las lectinas en varias especies de invertebrados hacia los diferentes grupos sanguíneos, en el cita como representante del grupo de los crustáceos al cangrejo nadador *Callinectes danae* Smith, con especificidad hacia eritrocitos humanos tipo A₁ y A₂; Cornick y Stewart en 1968 (10), detectaron y caracterizaron parcialmente una de las lectinas de la hemolinfa del bogavante o langosta americana *Homarus americanus* H. Milne; posteriormente en 1974 Hall y Rowlands (33, 37) identificaron múltiples aglutininas en esa misma especie, de las cuales dos de estas tienen especificidad hacia eritrocitos humanos tipo O y de ratón, las cuales caracterizaron químicamente determinando la especificidad por carbohidratos e incluso llevaron a cabo la comparación de una de las lectinas con la hemaglutinina del bogavante espinoso *Panulirus argus* (Latreille) obtenida por Weinheimer en 1971 (46), que tiene características químicas similares excepto en la especificidad por eritrocitos de ratón la cual no presenta la hemaglutinina de *P. argus* (Latreille). Por otra parte McKay y Jenkin (4, 11) realizaron estudios en el cangrejo australiano *Parachaeraps bicarinatus* acerca de la participación de la lectina en el mecanismo de resistencia a la bacteria patógena del género *Pseudomonas* sp., también llevaron a cabo estudios sobre la

fagocitosis de eritrocitos humanos y de carnero por hemocitos de *P. bicarinatus* y del cangrejo del arrecife *Ozius truncatus*. Smith y Goldstein en 1971 (47) detectaron la presencia de aglutininas en la hemolinfa del cangrejo terrestre *Cardisoma guanhumi* Latreille; Miller y colaboradores en 1972 (48) caracterizaron químicamente una de las tres aglutininas presentes en la hemolinfa del cangrejo rojo de Louisiana *Procambarus clarkii* (Girard); en 1973 Pauley (49) determinó la especificidad que tiene una hemaglutinina del cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathbun, por eritrocitos de pollo y conejo, además realizó estudios de inmunización en ésta especie utilizando eritrocitos de dichos vertebrados, observando un ligero incremento del título de la actividad aglutinante 48 horas posterior a la inmunización, el mismo autor en 1974 (20) hace la comparación de algunas características químicas y físicas de la hemaglutinina de *C. sapidus* R., con otras aglutininas de invertebrados reportándola como la única hemaglutinina con peso molecular mayor de 100 000 Da entre los invertebrados, asumiendo además que se trata de una proteína globular; en 1983 Vasta y cols. (34), detectaron actividad de lectinas en el suero del langostino de agua dulce *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), con especificidad hacia eritrocitos humanos y otras especies de vertebrados como carnero, perro, gato, bovino y ganso, reportando como mejores inhibidores a glicoproteínas que contienen ácido siálico como la mucina de la glándula submaxilar bovina, la fetuína y el ácido colomínico. Posteriormente Amirante y cols. en 1984 (26)

detectaron dos lectinas en el estomatópodo *Squilla mantis* (Linnaeus) con especificidad hacia eritrocitos humanos tipo A y O, ubicando su presencia sobre la membrana de granulocitos. Finalmente, se cuentan con los estudios realizados por Ravindranath y cols. quienes en 1985 (32) purificaron una lectina del cangrejo roca *Cancer antennarius* Stimpson, por cromatografía de afinidad utilizando mucina de la glándula submaxilar bovina acoplada a agarosa, caracterizaron su especificidad hacia estructuras que contienen ácido siálico y determinaron su peso molecular en 36 KDa. (Tabla 2).

Tabla 2. PRESENCIA DE LECTINA EN LA HEMOLINFA DE DIVERSAS ESPECIES DEL ORDEN DECAPODA (CRUSTACEA).

ESPECIE	LECTINAS*	REFERENCIA
Fam. Squillidae <i>Squilla mantis</i> (Linnaeus)	2	(26)
Fam. Palinuridae <i>Panulirus interruptus</i> (Randall)	10	(43)
<i>P. argus</i> (Latreille)	1	(46)
Fam. Diogenidae <i>Paguristes ulreyi</i> Schmitt	1	(45)
Fam. Homanidae <i>Homarus americanus</i> H. Milne	ND	(37)
Fam. Palaenomidae <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (De Man)	ND	(34)
Fam. Cambaridae <i>Procambarus clarkii</i> (Girard)	3	(48)
Fam. Coenobitidae <i>Birgus latro</i> (Linnaeus)	1	(21)
Fam. Paguridae <i>Eupagurus prideauxii</i> (= <i>Pagurus prideauxi</i> Leach)	1	(39)
Fam. Cancridae <i>Cancer antennarius</i> Stimpson	1	(32)
<i>C. pagurus</i> (= <i>Ucides cordatus</i> (Linnaeus))	1	(42)
Fam. Portunidae <i>Callinectes sapidus</i> Rathbun	2-3	(49)
<i>C. danae</i> Smith	1	(8)
<i>Carcinus maenas</i> (Linnaeus)	1	(44)
Fam. Gecarcinidae <i>Cardisoma guanhumi</i> Latreille	1	(47)
Fam. Xanthidae <i>Ozium truncatus</i> _____	1	(4)
Fam. Majidae <i>Maja squinado</i> (Herbst)	1	(19)
Fam. ? <i>Parachaeraps bicarinatus</i> _____	1	(4)

* Número de lectinas reportadas para cada especie. ? = no se localizó la posición taxonómica _____ y autor. ND = No determinado.

IV. MATERIAL Y METODOS.

OBTENCION Y TRATAMIENTO DE LA HEMOLINFA.

La hemolinfa se extrajo de organismos adultos machos y hembras del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), colectados en el Centro Piscícola "El Jicarero" Jojutla, Morelos. La hemolinfa se obtuvo por punción pericárdica utilizando una jeringa de 3 ml (Plastipak B-D con aguja 21 X 32 mm); posteriormente la hemolinfa se dejó coagular con la finalidad de obtener el suero total y de esta manera eliminar los factores de coagulación. Una vez formado el coagulo de hemolinfa éste fue centrifugado a 16 000 rpm (ultracentrifuga MSE superspeed 50) durante 30 min a 4 °C, eliminando el material precipitado y el suero sobrenadante, fue dializado exhaustivamente contra agua destilada (6 lts. de agua destilada aproximadamente) durante 72 horas a 4 °C, haciendo tres intercambios de agua; el material dializado fue centrifugado nuevamente a 16 000 rpm durante 15 min a 4 °C, el material precipitado se desecho y el sobrenadante (al cual se le denominó suero dializado) se conservó a -10 °C hasta su utilización para llevar a cabo la purificación de la lectina.

ACTIVIDAD AGLUTINANTE.

La presencia de la hemaglutinina en el suero del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.), se demostró por medio de la técnica de doble dilución seriada en una placa rígida de microtitulación (Dynatech laboratories, INC), ésta técnica consiste en diluir 25 μ l de suero dializado en forma sucesiva (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc.), en la placa de microtitulación en la que previamente se colocó 25 μ l de solución salina isotónica al 0.9% (NaCl 0.9% p/v). Esta mezcla se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente (22 °C), y posteriormente se adicionó a cada pozo 25 μ l de eritrocitos al 2% previamente lavados en solución salina isotónica.

Los ensayos se realizaron por duplicado utilizando eritrocitos de carnero, cerdo, bovino, burro (donados por la Fac. de Veterinaria, UNAM), gato, conejo, rata (cepa Wistar), ratón (donados por el Bioterio, UAEM) y humanos tipo A₁, A₂, B y O (donados por el Banco Central de sangre, Centro Médico Nal., IMSS, México, D.F.); el resultado se evaluó 45 minutos después de adicionar los eritrocitos, mediante la observación directa.

El título de la actividad aglutinante se expresa como el inverso de la última dilución con actividad hemaglutinante.

Los ensayos de actividad aglutinante se llevaron a cabo en presencia de eritrocitos normales, eritrocitos tratados con enzima pronasa (de *Streptomyces griseus*) (50), y eritrocitos tratados con enzima neuraminidasa (de *Clostridium perfringens*) (51) (Sigma Chemical Company St. Mo. USA).

El tratamiento de eritrocitos con la enzima pronasa (con la finalidad de modificar la estructura normal de la membrana celular), consistió en adicionar 1 mg de enzima diluída en 100 μ l de solución salina isotónica a cada paquete de eritrocitos (0.5 ml) de las diversas especies de vertebrados, previamente lavados con solución salina isotónica y dejando estos incubar durante 1 hr a 37 °C; una vez tratado el paquete de eritrocitos con la enzima, fue lavado tres veces con solución salina isotónica por centrifugación (Centrífuga clínica MSE), a 3 000 rpm y temperatura ambiente de 22 °C durante 5 minutos para eliminar la enzima; finalmente, se ajustó la concentración de eritrocitos al 2 % v/v con solución salina isotónica, y se llevó a cabo el ensayo de actividad aglutinante como anteriormente fue descrito.

El tratamiento de los eritrocitos con la enzima neuraminidasa (para eliminar residuos de ácido N-acetil neuramínico), consistió en adicionar 0.1 unidades (U) de la enzima a cada (0.5 ml) paquete de eritrocitos, dejándolos incubar a 37 °C durante 1 hr. Posteriormente el paquete de eritrocitos se

lavó tres veces con solución salina isotónica por centrifugación a 3 000 rpm (22 °C) durante 5 minutos, y por último se ajustó la concentración de eritrocitos al 2% v/v con solución salina isotónica para ser utilizados en el ensayo de actividad aglutinante.

PURIFICACION DE LA LECTINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

La purificación de la lectina del langostino *M. rosenbergii* (D.), se llevó a cabo por cromatografía de afinidad utilizando como matriz a). fetuina acoplada a Sepharosa 4-B (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Suecia) y b). estroma acoplado a Sephadex G-25 (Pharmacia).

a). Fetuina-Sepharosa 4-B.

Una columna cromatográfica conteniendo 5 ml de fetuina acoplada a Sepharosa 4-B (aproximadamente 30 mg de fetuina), previamente equilibrada con una solución amortiguadora de acetato de sodio 2.5 mM, NaCl 0.1 mM, pH 6 y con una velocidad de flujo de 7 ml/hr, se le aplicó 1 ml (100 µg de proteína) de suero dializado de *M. rosenbergii* (D.); el material no retenido (NR) se eluyó con amortiguador de acetato de sodio hasta que la densidad óptica (DO) a 280 nm fue <0.001 nm y el material retenido conteniendo a la lectina (R) se eluyó con 2 ml de glicina/HCl 0.1 M, pH 2.8. Las fracciones eluidas se colectaron

en volumen de 2 ml, y se les determinó densidad óptica a 280 nm; finalmente a cada fracción (R) se ajustó el pH a 6 con NaOH 1M, para determinar la actividad aglutinante de la lectina en presencia de eritrocitos de rata, y de esta manera detectar la presencia de la lectina purificada.

b). Estroma-Sephadex G-25.

Con la finalidad de corroborar la especificidad de la lectina hacia los diferentes tipos de eritrocitos detectados en los ensayos de actividad aglutinante, se llevaron a cabo ensayos de purificación por cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos de rata, conejo, pollo y humanos tipo O colocados en diversas columnas (1 X 5 cm). El estroma se obtuvo por lisis de eritrocitos y lavados continuos en presencia de amortiguador de fosfatos 0.005 M pH 7.4 de acuerdo al método descrito por Dodge y cols. (52), posteriormente se incubó el estroma en solución de glutaraldehído al 2% en agua (v/v) durante 12 hrs en agitación constante, y por último se adicionó al estroma glicina 1M para bloquear grupos aldehídos libres. Una vez tratado el estroma fué mezclado con Sephadex G-25 (Pharmacia) y aplicado a una columna cromatográfica de acuerdo al método utilizado por Zenteno y Ochoa (53).

A cada columna conteniendo estroma acoplado a Sephadex G-25, previamente equilibrada con el amortiguador de acetato de sodio 2.5 mM, NaCl 0.1 mM, pH 6, se le aplicó 0.3 ml de lectina de M.

rosenbergii (D.) purificada por cromatografía de afinidad en fetuina-Sepharosa 4-B, el material no retenido (NR) se eluyó con el amortiguador de acetato pH 6 y el material retenido (R) se eluyó al agregar 2 ml de glicina/HCl 0.1M pH 2.8. Las fracciones se colectaron en volúmen de 2 ml, determinando a cada una la densidad óptica a 280 nm y la actividad hemaglutinante con eritrocitos de rata.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.

A las diferentes fracciones NR y R que se obtuvieron en ambos procesos de purificación se les determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (54) el cual, se basa en el cambio de coloración en respuesta a las diferentes concentraciones de proteína.

La solución de Bradford está compuesta por 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 disueltos en 50 ml de etanol al 95 %, esta solución se mezcla con 100 ml de ácido fosfórico al 85 %, y la mezcla se diluye en 1 000 ml de agua destilada. La concentración de proteína se determinó a una D.O. de 595 nm. Como estandar se utilizó albúmina sérica bovina cristalizada (en diluciones de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma Chemical, Co. St. Louis Mo. USA). A 200 μl de cada fracción se le adicionó 2 ml de la

solución colorante, se dejó incubar durante 3 minutos y se le determinó D.O. a 595 nm.

CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS.

El contenido total de carbohidratos se determinó por el método de fenol-ácido sulfúrico (55), la solución está compuesta por fenol al 5% disuelto en ácido sulfúrico al 60%, y el método consiste en adicionar 3 ml del reactivo fenol-ácido a cada muestra de 1 ml conteniendo de 10-100 μg de carbohidrato, la mezcla se incubó a 100 °C durante 10 minutos y posteriormente se determinó la D.O. a 495 nm. Como referencia se utilizó glucosa.

COMPOSICION DE CARBOHIDRATOS.

Para el estudio de la composición de carbohidratos de la lectina *M. rosenbergii* (D.) se hidrolizarón 50 μg de lectina en 1 ml de metanol/HCl 0.5 M durante 24 hrs a temperatura de 110 °C, posteriormente se prepararon derivados trifluoro-acetil-aditoles de los azúcares hidrolizados adicionando 100 μl de piridina y 100 μl de ácido trifluoroacético. La composición de los azúcares se determinó por cromatografía de gases por el método de Zanetta y cols. (56), agregando los derivados trifluoro-acetil-aditoles a una columna conteniendo silicón

OV-210 al 3%; el programa de temperatura se estableció de 100 a 240 °C, con un incremento de 1 °C por minuto. Como estandar interno se utilizó mio-inositol.

El estudio se llevó a cabo en la Universidad de Ciencias y Técnicas de Lille, Francia.

COMPOSICION DE AMINOACIDOS.

100 µg de lectina purificada por cromatografía de afinidad en matriz de fetuina-Sepharosa 4-B (Pharmacia) se hidrolizaron en tubos sellados, conteniendo HCl 6N a 100 °C durante 24, 48 y 72 hrs; la determinación de aminoácidos se llevó a cabo en un analizador de aminoácidos Durrum. La concentración de aminoácidos se reporta tomando el peso molecular de la lectina como 14 KDa.

Este estudio fue realizado en el Instituto de Cáncer de Lille, Francia.

ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR Y COEFICIENTE DE SEDIMENTACION.

La determinación del peso molecular y el grado de homogeneidad de las fracciones purificadas por cromatografía de afinidad fetuina-Sepharosa 4-B se determinaron por:

a). Cromatografía de filtración y b). Ultracentrifugación, (determinándose en este último ensayo el coeficiente de sedimentación de la lectina).

a). Cromatografía de filtración.

A una columna cromatográfica (1.2 X 100 cm) conteniendo Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), previamente equilibrada con agua destilada y con una velocidad de flujo de 12 ml/hr, se aplicaron seis diferentes proteínas con peso molecular conocido, las proteínas disueltas en una concentración de 5 mg/ml en solución salina isotónica. Las proteínas estandar fueron: azul dextrán (2,000 KDa.) albúmina sérica bovina (65 KDa.); ovoalbúmina (43 KDa.); media molécula de hemoglobina (32 KDa.); mioglobina (17.2 KDa.) y citocromo C (12.4 KDa.).

Una vez estandarizado el volumen de exclusión de las proteínas con diferente peso molecular se aplicó una alícuota (2 mg/1 ml) de la lectina a la columna cromatográfica de filtración, las fracciones tanto de las proteínas estandar como de la lectina se colectaron en volumen de 2.5 ml, detectando la presencia de la lectina por absorbancia a 280 nm, y por actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos de rata.

b). Ultracentrifugación.

Los ensayos de ultracentrifugación se realizaron en

gradientes de sacarosa de 5-25% en una centrifuga Beckman LS-65 (Beckman Instruments, INC.) a 30 000 rpm durante 12 hrs a 20 °C de acuerdo con el método descrito por Rendón y Calcagno (57). La velocidad de sedimentación ($S_{20,w}$), se calculó en el mismo ensayo de acuerdo a Martin y Ames (58) comparando el gradiente de sedimentación de la lectina con el de las proteínas de coeficiente de sedimentación conocido: catalasa (11.3), ovoalbúmina (4.65) anhidrasa carbónica (3.5); mioglobina (2.0) y citocromo C (1.71).

PUNTO ISOELECTRICO.

El punto isoeléctrico (pI) de las moléculas determinado en un rango amplio de pH, permite conocer la característica ya sea básica o ácida de la proteína purificada. El punto isoeléctrico de la lectina purificada (25 µg de proteína) por cromatografía de afinidad fue determinado en un gel de poliacrilamida al 7% de acuerdo al método del instructivo de LKB Biotechnology (59), utilizando anfolitos 0.1% v/v (Browman, Uppsala Suecia) con rango de pH de 3.5 a 10. Como referencia de punto isoeléctrico conocido se utilizaron las proteínas: mioglobina 7.0 y 7.4; anhidrasa B 5.9; y glucosa oxidasa 4.0 (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA).

La lectina purificada y las proteínas de referencia fueron

focalizadas aplicando una corriente de 400 mA (50 mA²/8h), posteriormente la placa fue lavada en ácido acético:metanol: agua (3:1:6) durante 48 hrs, para eliminar los restos de anfolitos, y finalmente teñir con azul brillante de Coomassie R-250 0.2% en ácido acético, el exceso de colorante se eliminó lavando con ácido acético al 3%.

El pI de la lectina y el gradiente de pH se determinó cortando la placa de acrilamida en fracciones de 0.3 X 1 cm, cada fracción se incubó 24 hrs en 0.5 ml de agua destilada a 4 C; posteriormente se determinó el pH (Registrador Potenciómetro, Conductronic pH 20 equipado con un electródo semi-micro) y actividad aglutinante en presencia de eritrocitos de rata como se ha descrito.

ESPECTRO-DE ABSORBANCIA.

El estudio del espectro de absorbancia de la lectina (0.1 mg/100 μ l) del suero de *M. rosenbergi* (D.) purificada por cromatografía de afinidad, se determinó en un espectrofotómetro Beckman Du-70 (Beckman Instruments, INC), la lectura se estableció en un rango de absorbancia de 200 a 350 nm.

ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS.

Para determinar la especificidad de la lectina obtenida por fetuina acoplada a Sepharosa 4-B, se realizaron ensayos de inhibición de 4 unidades hemaglutinantes (UHA) de la lectina utilizando como inhibidores carbohidratos simples y complejos, así como glicósidos (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA) y glicoproteínas con estructura glicánica conocidas (estos últimos donados por la Universidad de Ciencias y Técnicas de Lille, Francia).

Los carbohidratos simples, complejos y los glicósidos en concentración de 0.1 M (ver Tabla 3), fueron colocados (25 μ l) en una placa de microtitulación donde se diluyó previamente de manera seriada la lectina en solución salina isotónica, la mezcla se dejó incubar 2 horas a temperatura ambiente (22 °C) antes de adicionar los eritrocitos normales de rata al 2%. Como referencia se utilizó a la lectina diluida sin inhibidor, ajustándose el volumen final a 50 μ l en cada pozo con solución salina isotónica. El efecto inhibitorio se aprecia comparando el título de actividad de la lectina de referencia con el de las diluciones que han sido incubadas con diversos carbohidratos y glicósidos.

Tabla 3. CARBOHIDRATOS, GLICOSIDOS Y GLICOPROTEINAS UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE INHIBICION DE LA LECTINA *M. rosenbergii* (D).

-
- Azúcares simples: D-xilosa, D-manosa, D-maltosa, D-glucosa, D-galactosa, lactosa, arabinosa, α -L-fucosa, D-fucosa, sacarosa.
 - Azúcares compuestos: heparina, protamina, condroitin sulfato, dextrán sulfato.
 - Glicósidos: p-nitro-fenil-galactosa; α -D-galactosamina 1 fosfato; ácido β -metil-neuramínico
 - Azúcares N-acetilados: sialil lactosa (α -2, 3); N-acetil-D-glucosamina; N-acetil-D-galactosamina; N-sialil lactosa -(α -2, 6); N-acetil-D-lactosamina -(β -1, 4); ácido urónico ácido β -glicolil-neuramínico.
 - Glicoproteínas: transferrina, IgG, IgA, mucina submaxilar bovina, asialo mucina submaxilar bovina, fetuína, asialo fetuína, orosomucoide, mucina gástrica de puerco, glicoproteínas de estroma de rata, Conalbúmina de huevo de gallina, Conalbúmina de huevo de pavo.
-

La inhibición en presencia de azúcares N-acetilados y glicoproteínas (ver Tabla 3), se realizó en una placa de microtitulación, en cada pozo de la placa se agregaron 25 μ l de una solución de lectina del langostino purificada con un título de 4 UHA (ajustada previamente por dilución en solución salina), en esta solución de lectina, se diluyeron en forma seriada 25 μ l de los azúcares N-acetilados o las glicoproteínas, posteriormente

esta mezcla se incubó durante 2 hrs a temperatura ambiente (22 °C) y por último se adicionaron los eritrocitos normales de rata al 2%.

El testigo de no inhibición de la actividad por estructuras carbohidrato para ambos ensayos, consistió en diluir la lectina purificada únicamente en solución salina isotónica de manera seriada, y determinando su actividad aglutinante en presencia de eritrocitos de rata al 2%.

Los resultados de inhibición se reportan como la concentración mínima necesaria del carbohidrato para inhibir 4 UHA de la actividad aglutinante de la lectina (60).

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE.

Para determinar la estabilidad de la lectina a la temperatura, se incubaron alícuotas de suero dializado de *M. rosenbergii* (D.) a diferentes temperaturas (0, 4, 30, 40, 50 y 60 °C) durante 30 minutos; a cada fracción se le determinó el título de actividad aglutinante con eritrocitos normales de rata.

Como testigo positivo se utilizó una alícuota de suero incubado a temperatura ambiente (22 °C).

DEPENDENCIA A METALES.

Con la finalidad de establecer si la lectina de *M. rosenbergii* (D.) es dependiente a iones metálicos, se llevaron a cabo dos experimentos con relación a la actividad aglutinante (técnica descrita previamente) del suero dializado.

El primer ensayo consistió en sustituir la solución salina isotónica utilizada para la dilución de la hemaglutinina por solución amortiguadora conteniendo CaCl_2 ó MgCl_2 0.02 M, una vez diluido el suero dializado de manera seriada se dejó incubar durante 15 minutos y por último se adicionaron los eritrocitos de rata.

En el segundo ensayo se determinó la actividad aglutinante a una alícuota del suero dializado de *M. rosenbergii* (D.), previamente dializada contra agua desionizada, (con la finalidad de eliminar los iones metálicos de los que podría depender la lectina como factor de reconocimiento); la actividad aglutinante se llevó a cabo de igual manera en presencia de eritrocitos de rata.

OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-HEMOLINFA.

La evaluación del grado de pureza de la lectina obtenida por cromatografía de afinidad, se llevo a cabo por ensayos de inmunodifusión e inmunolectroforesis, utilizando anticuerpos anti-suero total. Los anticuerpos se produjeron inoculando por vía intraperitoneal a un conejo *Nueva zelanda* de tres meses de edad, con una emulsión compuesta de 500 μ l de suero total de *M. rosenbergii* (D.) mezclada con 500 μ l de hidróxido de aluminio, la emulsión se aplicó por vía intraperitoneal cada 10 días durante dos meses; el conejo fue sangrado de la vena marginal de la oreja. Al suero hiperinmune colectado se le adicionó sulfato de amonio sólido a una concentración final del 50% (p/v) en constante agitación y a una temperatura de 4 °C; posteriormente la mezcla fue centrifugada a 3 000 rpm a 4 °C; la fracción precipitada rica en inmunoglobulinas fué dializada contra solución salina isotónica para la eliminación del sulfato de amonio y almacenada a 4 °C hasta su uso.

INMUNODIFUSION.

El principio de la inmunodifusión se basa en la detección de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como es el agar o la agarosa. En este medio al ser solubles el antígeno y el anticuerpo se difunden, y cuando son reconocidos llegan a formar

bandas de precipitación lo cual, puede indicar un reconocimiento total o parcial.

El ensayo de inmunodifusión se realizó en placas de vidrio (1 x 3 cm) preparadas de acuerdo al método descrito por Ouchterlony (61), utilizando Bacto-agar (Difco) al 1.5% disuelto en solución salina isotónica (pH 7). En tres pozos periféricos adyacentes (a 0.4 mm de distancia) se aplicaron: 35 μ l en una proporción 1:8 de suero dializado; 15 μ l (15 μ g de proteína) de lectina de *M. rosenbergii* (D.) purificada por cromatografía; y 15 μ l de suero de conejo hiperinmune diluido 1:1. La placa de ensayo se incubó en una cámara húmeda durante 12 hrs a temperatura ambiente (22 °C), posteriormente la placa fue lavada con solución salina isotónica con cambios constantes durante tres días, se dejó secar en vidrio y se tiñó con azul brillante de Coomassie R-250 al 0.2% en ácido acético al 7%, el exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 3%.

INMUNDELECTROFORESIS.

Una variante de la observación de reacción antígeno-anticuerpo en un medio semisólido es la técnica de inmunolectroforésis descrita por Williams y Grabar (62) que consiste en la separación de los componentes antigénicos en un campo eléctrico previo al proceso de inmunodifusión simple (descrito anteriormente).

La inmunoelectroforesis se realizó en una placa de vidrio (10 X 10 cm) a la cual que se le vertió agarosa (Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia) al 1.5% en amortiguador de barbital sódico Tris/Veronal 0.05 M, pH 8.3: en un pozo se aplicó 25 μ l de suero dializado (45 μ g de proteína), y en el pozo adyacente (separado por un canal para la posterior adición de 500 μ l del suero anticuerpo-antihemolinfa en dilución 1:1), se aplicó 15 μ l de lectina (15 μ g), los componentes moleculares fueron separados con una corriente de 200 voltios por 120 min.

La inmunodifusión se realizó en presencia de anticuerpos anti-hemolinfa obtenidos en conejo y dejando incubar durante una noche en cámara húmeda a temperatura ambiente (22 °C), la placa se lavó en solución salina isotónica con cambios constantes (durante tres días), se dejó secar y se tiñó en solución azul brillante de Coomassie R-250 al 1% en ácido acético 7%, el exceso fue eliminado con ácido acético al 3%.

V. RESULTADOS.

Una lectina fue purificada por cromatografía de afinidad en fetuina-Sepharosa 4-B, a partir del suero dializado de organismos adultos machos y hembras del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (De Man).

La detección de la lectina en el suero dializado de *M. rosenbergii* (D.), llevado a cabo por los ensayos de actividad aglutinante en presencia de eritrocitos normales de las diversas especies de vertebrados, mostraron que la lectina posee únicamente actividad aglutinante con los eritrocitos de rata y conejo con un título de actividad de 128 y 64 UHA respectivamente (Tabla 4).

Cuando se analizó la actividad aglutinante del suero dializado en presencia de eritrocitos de rata y conejo tratados previamente con las enzimas, se observaron diferencias importantes ya que la actividad se incrementa el 100% cuando las células fueron tratadas con la pronasa sin embargo, la actividad disminuye el 50% cuando las células son tratadas con neuraminidasa en relación a los eritrocitos normales. No se detectó actividad para eritrocitos humanos, de caballo, cerdo,

burro, pollo, carnero, vaca, gato y perro aún después de recibir tratamiento enzimático (Tabla 4).

Tabla 4. ACTIVIDAD AGLUTINANTE DEL SUERO TOTAL DE *M. rosenbergii*, (D.) EN PRESENCIA DE ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES DE VERTEBRADOS.*

Eritrocitos	Normales	Tratados con enzimas	
		Pronasa ⁺	Neuraminidasa ⁺⁺
Humanos A ₁ , A ₂ , B, O	-	-	-
Burro	-	-	-
Caballo	-	-	-
Cerdo	-	-	-
Conejo	64	256	64
Pollo	-	-	-
Rata	128	256	64
Gato	-	-	-
Carnero	-	-	-
Vaca	-	-	-
Perro	-	-	-

* Los resultados son expresados como la inversa de la última dilución con actividad aglutinante.

⁺ Eritrocitos tratados con 1 mg/ml de enzima pronasa.

⁺⁺ Eritrocitos tratados con 0.1 U de enzima neuraminidasa.

Como se muestra en la Tabla 5 (Figura 1), en el proceso de purificación utilizando como matriz de afinidad fetuina acoplada a Sepharosa 4-B, la cantidad de lectina que se logró purificar partiendo de una concentración de 100 mg de proteína (1 ml del suero dializado) fueron 0.014 mg de proteína; con este procedimiento es posible recuperar el 50% de la actividad hemaglutinante con un incremento de 3,246 veces la actividad específica de la lectina con respecto al suero dializado.

Tabla 5. PROCESO DE PURIFICACION DE LA LECTINA DE *M. rosenbergii*, (D.) EN FETUINA-SEPHAROSA 4-B.

Fracción	Proteína total (mg)	UHA*	Actividad específica (UHA/mg) ⁺
Suero	100 ⁺⁺	1280	12.8
Fracción No retenida	87	0	0
Fracción Retenida	0.014	640	45,714.0

* Unidades hemaglutinantes con eritrocitos de rata tratados con pronasa.

+ Actividad específica = UHA/mg de proteína.

++ Los 100 mg de proteína fueron obtenidos en 1 ml del suero dializado de *M. rosenbergii*.

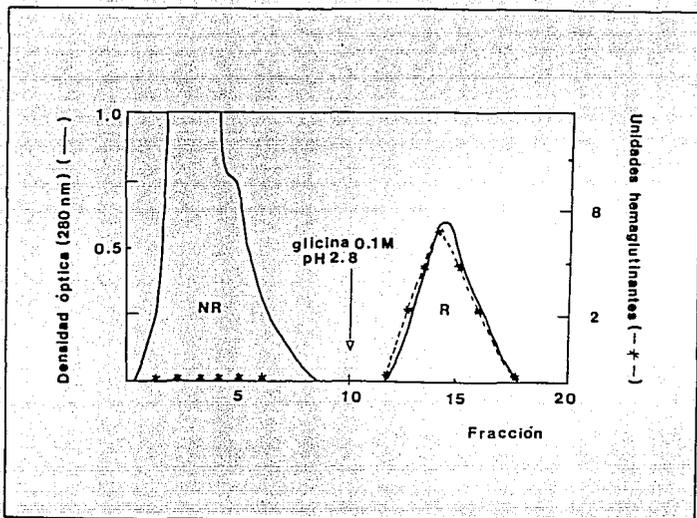


Figura 1. Purificación de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) por cromatografía de afinidad en fetuina-sepharosa 4-B. A la columna (10 X 1 cm) se le aplicó 100 mg de proteína de suero dializado, el material no retenido (NR) se eluyó con amortiguador de acetato de sodio; la lectina (R) se eluyó con glicina/HCl 0.1 M, pH 2.8. A cada fracción se le determinó densidad óptica (D.O.) a 280 nm (—) y actividad aglutinante (UHA) (-*-*) en presencia de eritrocitos de rata.

En los ensayos para la purificación de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) utilizando como matriz estroma de eritrocitos de humano tipo O, rata y conejo, se observó que ésta proteína es

retenida únicamente en las columnas cromatográficas conteniendo estroma de eritrocitos de rata y conejo (Figura 2), lo cual confirma que la lectina presenta sólo especificidad hacia ambos tipos de eritrocitos los cuales, presentan un alto contenido de ácido D-acetil-siálico en la superficie de su membrana (62).

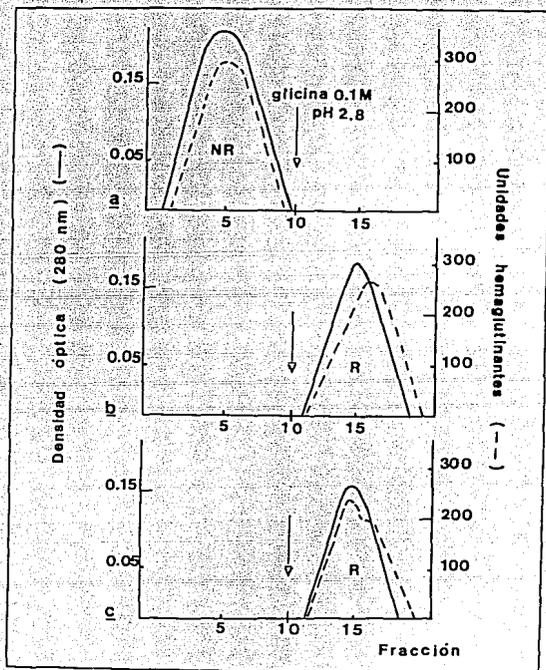


Figura 2. Purificación de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) por cromatografía de afinidad en estroma-Sephadex G-25. Cada columna (5 X 1 cm) conteniendo estroma de eritrocitos: a). humano tipo O, b). rata y c). conejo. A cada columna se le aplicó (350 μ g de proteína) lectina purificada. El material no retenido (NR) se eluyó con acetato de sodio pH 6; el material retenido (R) se eluyó con glicina/HCl pH 2.8. A cada fracción se le determinó densidad óptica a 280 nm (—) y actividad aglutinante (---) en presencia de eritrocitos de rata.

Comparando los resultados para la purificación de la lectina de *M. rosenbergii* (D.), por la matriz fetuina-Sepharosa 4-B con la matriz de estroma (rata)-Sephadex G-25, partiendo de una concentración de 100 μ g de proteína, nos indica un bajo rendimiento en el proceso de purificación en la matriz de estroma (rata)-Sephadex G-25, ya que sólo es posible recuperar un 0.007 μ g de proteína que contiene un 30% de la actividad aglutinante de la lectina en presencia de eritrocitos de rata (ver Tabla 6).

Tabla 6. ANALISIS COMPARATIVO DE LA PURIFICACION* DE LA LECTINA DE *M. rosenbergii* (D.), POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Matriz de afinidad	Proteína recuperada (%)	(UHA) % recuperadas	Indice de purificación**
Fetuina-Sepharosa 4-B	0.014	50%	3571.4
Estroma-rata Sephadex G-25	0.007	30%	428.8

* A partir de 100 mg de proteína.

** Indice de purificación = incremento de la actividad específica de la lectina purificada en comparación con la del suero.

La lectina purificada del langostino *M. rosenbergii* (D.), es una glicoproteína que posee aproximadamente el 10% de carbohidratos por peso. Los estudios sobre la composición y concentración de carbohidratos indican que la lectina del suero del langostino posee un alto contenido de ácido siálico (6 residuos/mol.), de galactosa (4 residuos/mol.) y de manosa (3 residuos/mol.); y en menor concentración N-acetil-D-glucosamina (2 residuos/mol.) y N-acetil-D-galactosamina (1 residuo/mol.); (Tabla 7).

Tabla 7. COMPOSICION Y CONCENTRACION DE CARBOHIDRATOS DE LA LECTINA DE *M. rosenbergii* (D.).

Carbohidrato	Núm. de residuos /Mol.*	M / %. **
Ac. siálico	6.00	37.50
Galactosa	4.00	25.00
Manosa	3.00	18.75
N-acetil-D-glucosamina	2.00	12.50
N-acetil-D-galactosamina	1.00	6.25
Glucosa	Trazas	-
Xilosa	Trazas	-
Fucosa	0	-

* Considerando un peso molecular de 14 KDa.

** Porcentaje en concentración molar que representa cada carbohidrato.

La composición de aminoácidos de la lectina indica que en mayor concentración contiene glicina 16.3%, serina 13.7%, glutámico 13.1%, aspártico 8.9% y en menor concentración alanina 8.7%, (Tabla 8).

Tabla 8. COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LA LECTINA DE *M. rosenbergii* (D.) (basado en un peso molecular de 14 KDa).

Aminoácido	Concentración (mM) *	M(%) **
Glicina	238.2	16.3
Serina	199.7	13.7
Glutámico	191.5	13.1
Aspártico	130.5	8.9
Alanina	127.3	8.7
Leucina	88.5	6.1
Valina	73.6	5.0
Treonina	68.6	4.7
Lisina	64.7	4.4
Arginina	47.0	3.2
Prolina	46.9	3.2
Fenilalanina	41.3	2.8
Histidina	38.1	2.6
Tirosina	36.2	2.5
Metionina	16.8	1.2
Cisteina	0.7	0.0

* mM = miliMolar.

** M (%) = porcentaje en concentración molar que representa cada aminoácido.

El peso molecular de la lectina de *Macrobrachium rosenbergii* (D.), determinado por cromatografía de filtración en Sephadex G-100, comparado con las diferentes proteínas con peso molecular conocido indica que la lectina purificada por cromatografía de afinidad presenta un peso molecular de 14 KDa (Figura 3). Sin

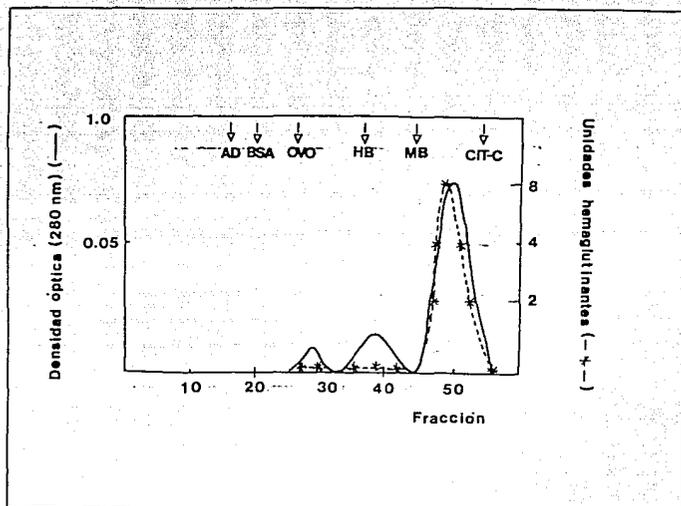


Figura 3. Determinación del peso molecular de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) por cromatografía de filtración en una columna de Sephadex G-100 (100 X 1.2 cm). Los marcadores de peso molecular fueron: azul dextrán (2,000 000), albúmina sérica bovina (67,000), ovoalbúmina (43,000), media molécula de hemoglobina (32,000), mioglobina (17,000) y citocromo C (10,400). La lectina fue eluida a 10 ml/h, colectando fracciones de 2.5 ml; a cada fracción de la lectina se le determinó densidad óptica a 280 nm (—) y actividad aglutinante (-*-*) en presencia de eritrocitos de rata.

embargo, por el método de ultracentrifugación se obtuvo un peso molecular de 20 KDa (Figura 4); esta diferencia de peso molecular con respecto a la determinada por filtración molecular podría estar dada por una interacción inespecífica de la lectina con las moléculas de sacarosa utilizadas en el gradiente para la ultracentrifugación.

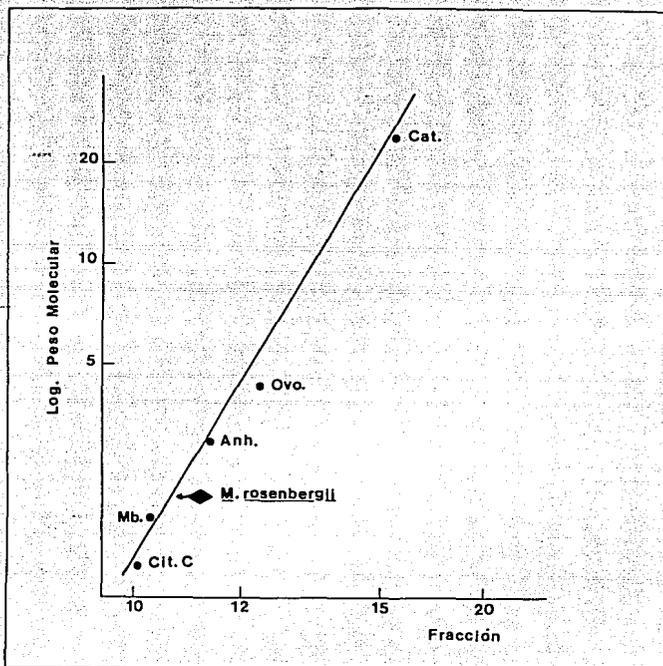


Figura 4. Determinación del peso molecular de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de 5-25 %. Las proteínas utilizadas como referencia fueron: catalasa (24 KDa.); ovoalbúmina (43 KDa.); anhidrasa carbónica (29 KDa.) mioglobina (17.2 KDa.); citocromo C (12.4 KDa.).

Con respecto al valor del coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) para la lectina del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.), comparada con las proteínas de coeficiente de sedimentación de referencia, fue de 1.4 S (Figura 5).

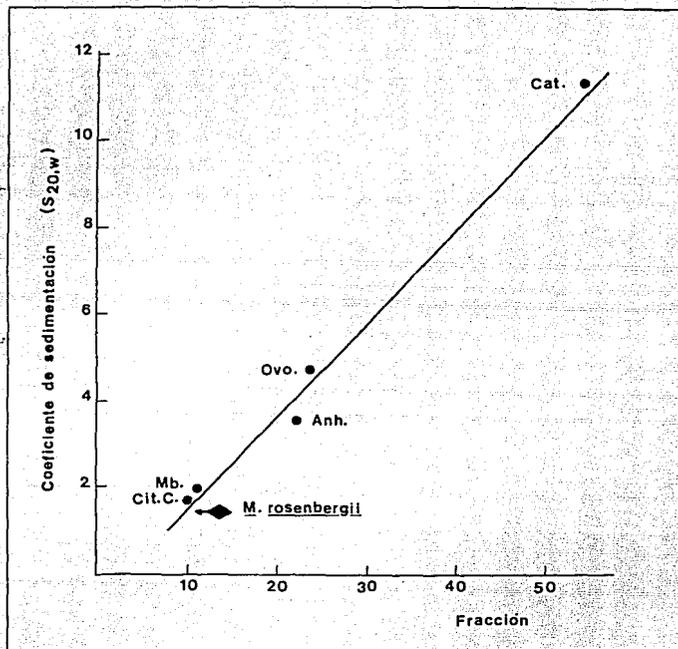


Figura 5. Coeficiente de sedimentación de la lectina de *M. rosenbergii* (D.), comparada con las proteínas, de coeficiente de sedimentación conocido: catalasa (11.3); ovoalbúmina (4.65); anhidrasa carbónica (3.5); mioglobina (2.0) y citocromo C (1.71).

El punto isoeléctrico de la lectina purificada por cromatografía de afinidad en fetuina-Sepharosa 4-B, determinado en gel de poliacrilamida en presencia de anfólitos en un rango de pH 3.5-10 muestra que la lectina está compuesta por cuatro moléculas principales cuyo punto isoeléctrico está distribuido entre el pH 5.4 y 6.1 (Figura 6 y 7).

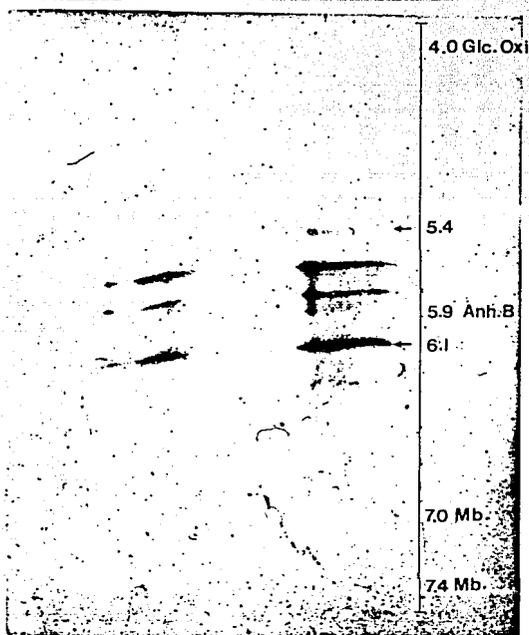


Figura 6. Punto isoeléctrico de la lectina de *M. rosenbergii* (D.) determinado por electroenfoque un gel de poliacrilamida al 7% , y anfólitos (pH 3.5-10). Las proteínas usadas como estándar son: mioglobina pH 7.0 y 7.4, anhidrasa B pH 5.9 y glucosa oxidasa pH 4.0, aplicando 40 μ g de cada una de las proteínas.

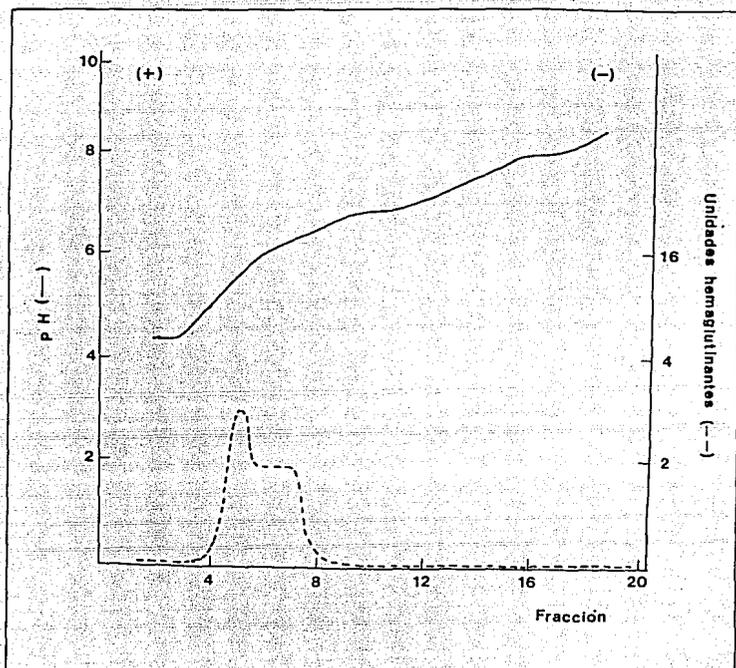


Figura 7. Isoelectroenfoque de la lectina de *M. rosenbergii* (D.), en el gel de poliacrilamida al 7%, utilizando 0.1% v/v de anfólitos con rango de pH 3.5-10. A cada fracción de 0.3 X 1 cm de gel se determinó pH (—) y actividad aglutinante en presencia de eritrocitos de rata (---).

El espectro de absorción de la lectina (0.1 mg/ml) del langostino *M. rosenbergii* (D.), muestra la presencia de un pico máximo en absorción a 280 nm, lo cual indica que la lectina purificada es una proteína que posee residuos de aminoácidos con radicales aromáticos (Figura 8).

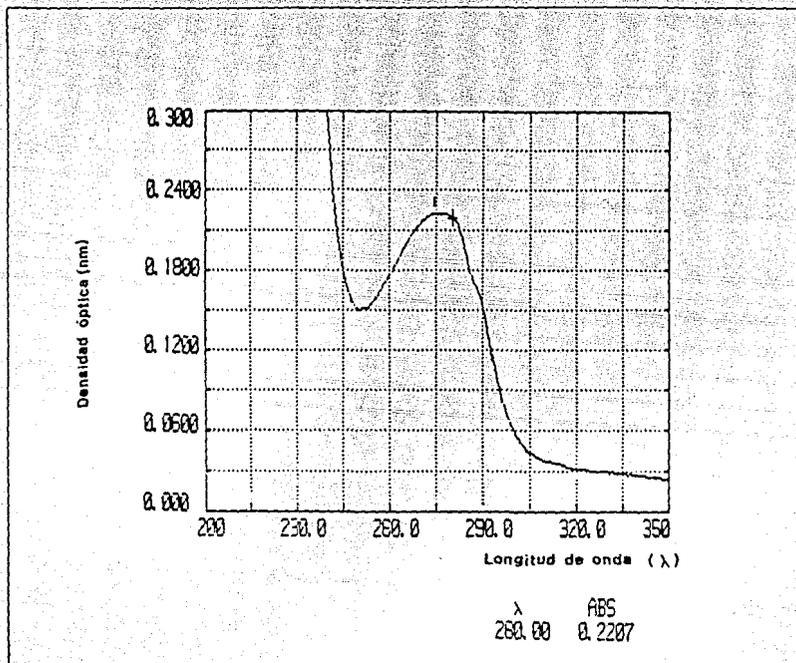


Figura 8. Espectro de absorción de 0.1 µg/ml de lectina de *M. rosenbergii* (D.) purificada por cromatografía de afinidad, con un rango de longitud de onda (λ) de 200 a 350 nm. (Espectrofotómetro Beckman Du-70).

En los ensayos de inhibición de la actividad aglutinante del suero dializado en presencia de azúcares simples, compuestos, N-acetilados, glicósidos y glicoproteínas a partir de una concentración de 100 mM, indicaron que la hemaglutinina muestra sólo afinidad hacia complejos estructurales de azúcares N-acetilados, glicósidos y glicoproteínas.

Entre los carbohidratos que tienen mayor capacidad para inhibir la actividad hemaglutinante del suero en presencia de eritrocitos de rata, se detectó a los azúcares N-acetilados: la N-sialil lactosa (α -2, 6), (25 mM), y en menor concentración N-acetil-D-lactosamina (β -1, 4), (25 mM); por el glicósido α -D-galactosamina-1-fosfato, (6.2 mM); y por el grupo de las glicoproteínas se detectó a la fetuina (50 mM), la mucina de la glándula submaxilar bovina (25 mM), la IgA humana (6.2 mM) y los glicopéptidos obtenidos de la membrana de eritrocitos de rata (3.1 mM), (Tabla 9).

Como se muestra en la Tabla 9, el proceso de desialización por hidrólisis ácida de la fetuina y de la mucina submaxilar bovina provoca que éstas moléculas pierdan la capacidad inhibitoria presentada por las moléculas nativas.

Tabla 9. CONCENTRACION MINIMA DE CARBOHIDRATOS, GLICOSIDOS Y GLICOPROTEINAS PARA INHIBIR 4 UHA* DE LA LECTINA PURIFICADA DE *M. rosenbergii* (D.).

Carbohidrato	Concentración
Azúcares N-acetilados	
sialil lactosa (α -2,3)	50 mM
N-acetil-D-glucosamina	50 mM
N-acetil D-galactosamina	50 mM
N-sialil lactosa (α -2,6)	25 mM
N-acetil-D-lactosamina (β -1,4)	25 mM
Glicósidos	
α -D-galactosamina-1-fosfato	6.2 mM
ácido β -metil-neuramínico	50 mM
p-nitro-fenil-galactosa	N.I.
Glicoproteínas	
Ig-A	6.2 mM
mucina submaxilar bovina	25 mM
asialo mucina submaxilar bovina	N.I.
fetuína	50 mM
asialo fetuína	N.I.
glicoproteína de estroma de rata	3.1 mM

N.I. = No inhibe a 100 mM. Otros compuestos sin actividad inhibitoria se presentan en la Tabla 3.

* En presencia de eritrocitos de rata normales.

El efecto de la temperatura sobre la actividad aglutinante en presencia de eritrocitos normales de rata, mostró que la lectina es estable a una temperatura menor de 30 °C durante 5 minutos ya que no se manifiesta cambio alguno, en el título de actividad aglutinante lo mismo ocurre cuando la lectina es incubada entre 0 y 4 °C. Sin embargo, a temperatura de 50 °C ó superior, la actividad aglutinante de la lectina desaparece rápidamente (Tabla 10).

TABLA 10. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA DE *M. rosenbergii* (D.).

Temperatura °C	Tiempo de incubación (minutos)	Actividad aglutinante
0-4	60	+
22	15	+
30	15	+
40	15	+
50	15	-
60	15	-

Los resultados de la dependencia de la hemaglutinina a metales, por ensayos de actividad aglutinante del suero previamente dializado en agua desionizada o bien sustituyendo la solución salina isotónica por solución amortiguadora de CaCl_2 ó MgCl_2 , no presentó cambio alguno en el título de la actividad hemaglutinante.

En el gel agarosa de la placa de inmunodifusión los anticuerpos anti-lectina producidos en conejo muestran el reconocimiento formando varias bandas de precipitación con el suero dializado, la lectina purificada forma una sola banda de precipitación que posee identidad total con los componentes del suero. En la Figura 9, se observan los diferentes grados de pureza de la lectina a partir de: 1). Lectina de *M. rosenbergii* (D.) purificada por cromatografía de afinidad fetuina-Sepharosa, que está representada por una banda y 2). Suero dializado, en la cual se observó una serie de bandas indefinidas lo que indica que hay más de una molécula presente en la hemolinfa.

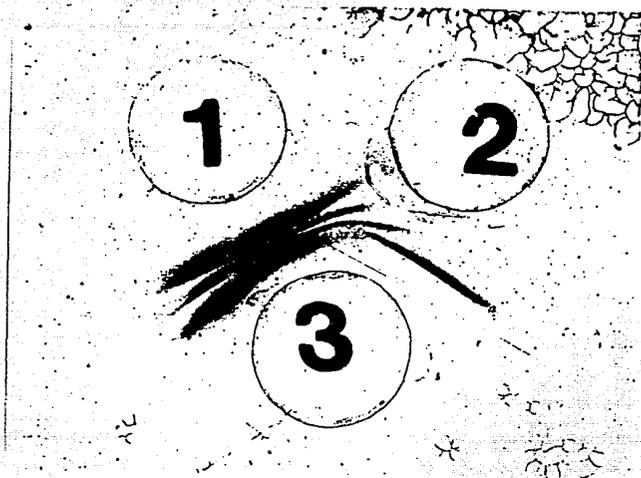


Figura 9. Inmunodifusión en agar al 1.5%. Reacción de identificación entre 1). Suero dializado (35 μ g). 2). Lectina pura (15 μ g). 3). Anticuerpos anti-hemolinfa.

El gel de inmunoelectroforésis se correlaciona con los resultados de las bandas de precipitación del gel agarosa en la inmunodifusión. La separación de los componentes del suero dializado y de la lectina en un campo eléctrico se representa en

la Figura 10 en la cual, se muestra las bandas de precipitación de: 1) Suero dializado, representando diversas bandas no definidas y 2) Lectina obtenida por cromatografía de afinidad representada por una sola banda.

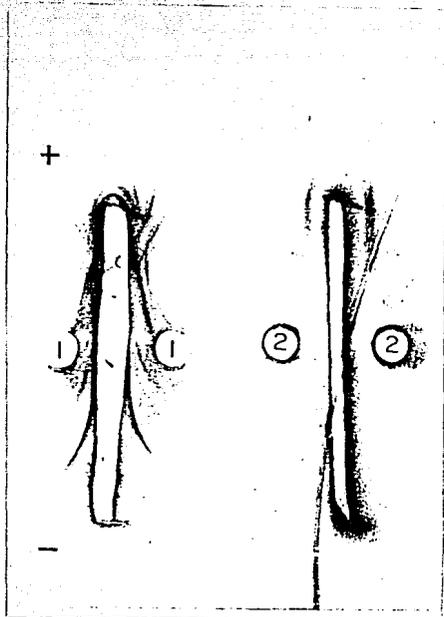


Figura 10. Inmunoelectroforesis en agarosa al 1.5 % en solución amortiguadora Tris/veronal pH 8.6. 1). Suero dializado en dilución (45 $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$). 2). Lectina pura (15 $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$).

VI. DISCUSION.

La presencia de lectinas en la hemolinfa de los invertebrados ha dado lugar para hacer estudios relacionados con los mecanismos de defensa. Se ha propuesto que debido a la especificidad que presentan las lectinas hacia estructuras carbohidrato que se encuentran sobre la superficie de membranas celulares, éstas podrían actuar como intermediarios en el mecanismo de defensa, reconociendo específicamente moléculas extrañas para ser enlazadas a la membrana de los hemocitos y posteriormente fagocitadas (28); sin embargo, la manera por la cual se lleva a cabo dicho reconocimiento aún no ha sido plenamente demostrado, debido muy posiblemente a que no se cuenta con un número considerable de lectinas de invertebrados bien caracterizadas, o posiblemente al hecho de que la concentración de lectina en tales organismos se encuentra en concentraciones muy bajas, por lo que se considera importante el tratar de identificar en primer lugar las características de la lectina de *M. rosenbergii* (De Man), para posteriormente establecer un método de purificación con alto rendimiento de lectina.

Por cromatografía de afinidad (utilizando fetuina acoplada a Sepharosa 4-B) se purificó una lectina del suero del langostino

Macrobrachium rosenbergii (D.). Por este método se obtuvo una recuperación de 0.014 mg de lectina partiendo de una concentración de 100 mg de proteína de suero dializado. Sin embargo al usar como matriz estroma de eritrocitos de rata, se obtuvo 0.007 μ g de proteína estos resultados sugieren que la concentración de la lectina en este organismo comprende menos del 1% de la proteína total de la hemolinfa; resultados similares son reportados para las especies *Homarus americanus* H. Milne Edwards, y *Panulirus argus* (Latreille), en los que la cantidad de lectina presente en la hemolinfa de ambas especies comprende de manera similar menos del 1% de la proteína total (purificadas por cromatografía de afinidad), esto indica que la presencia de la lectina en crustáceos se encuentra en baja concentración (33, 46).

La fetuina acoplada a Sepharosa 4-B utilizada para la purificación de la lectina de *M. rosenbergii* (De Man), es una glicoproteína que contiene estructuras N- y O-glicosídicas con un alto contenido de ácido siálico (hasta un 36%) (63), la obtención de un aceptable rendimiento en la purificación (50% de la actividad aglutinante), se debe indudablemente a la afinidad de la lectina por ésta glicoproteína como se demuestra en los ensayos de especificidad.

La lectina detectada por el espectro de absorbancia a 280 nm indica que es una proteína que contiene aminoácidos del grupo

aromático. Esta lectina purificada por cromatografía de afinidad muestra ser una glicoproteína de peso molecular de 14 KDa en su forma nativa. Sin embargo, el peso molecular determinado por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa de 5 a 25% se obtiene un peso de 20 KDa., lo cual puede ser explicado por una posible interacción que presente la lectina hacia la sacarosa la cual es utilizada en el gradiente de sedimentación, formando complejos moleculares, y por lo tanto manifestando un tamaño mayor a la molécula de lo real. Dicha interacción tendría por lo tanto que confirmarse o bien utilizar otra substancia para la determinación del peso molecular modificando esta técnica (por ejemplo, sustituyendo la sacarosa por el cloruro de cesio el cual no podría interactuar con la lectina).

En cuanto al coeficiente de sedimentación la lectina del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.) presenta un valor de 1.4 S comparado con las proteínas estandar. Entre las proteínas cercanas a la de *M. rosenbergii* (D.), con un valor de coeficiente de sedimentación conocido se encuentran la lectina del quelicerado *Limulus polyphemus* (Linn.) y la proteína de la especie *Callinectes sapidus* Rathbun, con un valor de 28 S (20, 21).

La lectina del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (D.) esta compuesta principalmente por los aminoácidos glicina, serina, glutámico y aspártico y su porción sacarídica por ácido

siálico, galactosa, manosa, N-acetil-D-galactosamina y N-acetil-D-glucosamina; comparando con otras especies como la del caracol de agua dulce *Pila globosa* (Swainson), la lectina está formada por 25% de carbohidratos, y la del molusco terrestre africano *Achatina fulica* Bowdich por un 35-40% (64, 65), en cuanto a la lectina del langostino *M. rosenbergii* (D.) contiene aproximadamente el 10% de azúcares por peso total.

Aparentemente esta lectina no requiere de iones de calcio y magnesio para la actividad aglutinante en comparación con la de otras especies como *Homarus americanus* H. Milne, *Panulirus argus* (Latreille), *Cancer antennarius* Stimpson, y *Callinectes sapidus* Rathbun, las cuales son dependientes de iones calcio (20, 32, 37, 46). La lectina de *M. rosenbergii* (D.) es lábil a temperaturas mayores de 50 °C durante 1 min., condiciones similares se han reportado para la lectina sérica de *C. sapidus* Rathbun, que fue estable a una temperatura menor de 50 °C y *P. argus* (Latreille) (20, 46), para otras proteínas como la limulina (*L. polyphemus* (Linn.)) se reporta estable hasta 56 °C (21) y para la especie *Procambarus clarckii* (Girard), la lectina se inactiva a 60 °C (48).

Hacemos notar que la lectina del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.), es una de las más pequeñas de acuerdo a las reportadas en la literatura, algunos autores indican que ciertas lectinas como la obtenida de la especie *Achatina fulica* Bowdich,

está formada por varias subunidades monoméricas de 15 KDa (65), y la limulina aislada de *Limulus polyphemus* (Linn.) que está formada por seis unidades de 18 KDa (21) sin embargo, en esos casos cada unidad monomérica al poseer un solo sitio receptor carece de capacidad de aglutinación, en cuanto a la lectina de *M. rosenbergii* (D.) podría tratarse de una proteína formada por una unidad monomérica única, que presenta dos sitios activos, lo que le permite reconocer más de una célula e inducir por lo tanto aglutinación.

La proteína purificada de *M. rosenbergii* (D.) está formada por cuatro grupos moleculares (tres grupos mayores) cuyo punto isoelectrico (pI) se encuentra entre el pH 5.4 y 6.1, la lectina de la especie *P. clarkii* (Girard) presenta características similares, en la cual, la actividad aglutinante está distribuida en un amplio rango de pH que oscila de 6.4 a 10.4 y de igual manera presenta similitud con respecto al pI de la lectina de *Achatina fulica* Bowdich, que se encuentra focalizada a pH de 5.9 (48, 65).

La lectina de *M. rosenbergii* (D.) reconoce predominantemente eritrocitos normales de rata y conejo, los cuales presentan un alto contenido de derivados O-acetil-siálico en la superficie de los eritrocitos (25% y 20% respectivamente) (63). En los ensayos de aglutinación utilizando eritrocitos de rata tratados con enzima neuraminidasa, la cual se ha reportado

que libera de un 15 hasta un 30% de ácidos N-acetil-siálico de la membrana de dichos eritrocitos (63), se observó un decremento significativo en la actividad aglutinante; considerando que la enzima elimina principalmente residuos de ácido N-acetil-siálico nos indica que nuestra lectina reconoce principalmente a los derivados de ácido O-acetil-siálico ya que son las moléculas que están expuestas en las membranas y que no han sido eliminadas de los eritrocitos al ser tratadas con dicha enzima.

En eritrocitos tratados con pronasa se aprecia un incremento en la capacidad de reconocimiento de la lectina, lo que indica que el tratamiento con pronasa provoca la liberación (o desenmascaramiento) de algunos receptores para esta lectina, dicho tipo de modificaciones a la respuesta con la lectina se ha identificado en las lectinas vegetales, y se ha llegado a proponer que tal incremento podría estar dado por la presencia de receptores ocultos (50, 51, 53).

En 1983, Vasta y cols. (34) reportaron actividad de hemaglutinina en *M. rosenbergi* (D.), con especificidad hacia eritrocitos de rata y conejo pero también para eritrocitos humano, caballo, oveja, gato, bovino y cerdo, sin embargo, en nuestros ensayos de aglutinación utilizando suero no dializado, obtuvimos actividad aglutinante en ciertas ocasiones hacia eritrocitos de humano y cerdo lo cual, podría estar dado por posibles factores que inducen un estado de agregación debido a la

hidrofobicidad que posee por ejemplo la hemocianina (66).

En cuanto a los resultados de la especificidad de la hemaglutinina de *M. rosenbergii* (D.), se demostró por los ensayos de inhibición de la actividad aglutinante de la lectina, que tanto azúcares N-acetilados (N-acetil-D-galactosamina, también reportada para *H. americanus* H. Milne y N-acetil-D-glucosamina reportada para *C. sapidus* Rathbun, (20, 33) como concentraciones mínimas de glicoproteínas (que contienen estructuras sacarídicas más complejas como fetuína, mucina submaxilar bovina, α -D-galactosamina-1-fosfato, ácido β -metil-neuramínico y glicoproteínas obtenidas de los eritrocitos de rata), son indispensables para el reconocimiento entre la lectina y el eritrocito; incluso la pérdida de residuos de ácido siálico de las glicoproteínas fetuína y mucina de la glándula submaxilar bovina que provoca que estas moléculas dejan de ser inhibidas de la actividad de la lectina lo cual sugiere que tales residuos son indispensables para la interacción con dichas glicoproteínas.

Como se ha observado en los ensayos de actividad aglutinante y en la inhibición de la misma por diferentes azúcares, los N-acetilados y el ácido siálico parecen ser un ligando importante para la lectina de *M. rosenbergii* (D.) aunque, el papel del ácido siálico en la célula aún no ha sido claramente comprendido, se ha observado por ejemplo que existe una interacción específica

entre los residuos siálicos de la superficie celular y algunas sialidasas virales (63).

Dado que el ácido siálico se ha localizado en la membrana celular en posición periférica de glicoconjugados se le ha atribuido la participación en la regulación de fenómenos biológicos tales como receptores y en la protección de células y organismos. Entre las lectinas consideradas específicas para ácido siálico se encuentran en la limulina del quelicerado *L. polyphemus* (Linn.), el cangrejo *Carcinoscorpius rotunda*, en el molusco terrestre africano *Achatina fulica* Bowdich y en la ostra gigante del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg) (21, 65, 67, 68).

La posible participación de la lectina del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.), en el proceso de reconocimiento de lo propio y no-propio aún esta por demostrarse, ya que si consideramos su afinidad por ácido siálico, es importante considerar que diversos agentes patógenos como la mayoría de las bacterias (excepto *Escherichia coli*, *Neisseria meningitides* y *Salmonella* sp. entre otras especies), y en diversos virus éste residuo sacarídico (ácido siálico) está ausente aunque, es más frecuente encontrarlo en protozoarios y moluscos (69, 70, 71).

Los ensayos de inmunodifusión e inmunolectroforésis nos

permite tomar en consideración que la hemolinfa tiene la capacidad de ser inmunogénica y por lo tanto es posible obtener anticuerpos anti-hemolinfa, ya que mediante estos ensayos se identificaron las fracciones de lectina purificada por cromatografía de afinidad; lo cual también nos permitirá demostrar por ejemplo, mediante ensayos inmunocitoquímicos la localización de la lectina en los hemocitos y su posible participación en el mecanismo de defensa.

VII. CONCLUSIONES.

De los resultados de este trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. Del la hemolinfa de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man), se aisló una lectina.
2. Por el método de cromatografía de afinidad utilizando fetuína acoplada a Sepharosa 4-B, es posible obtener 0.014 mg de lectina a partir de 100 mg de proteína de suero total.
3. La concentración de la lectina sérica de *M. rosenbergii* (De Man), comprende menos del 0.01% de la proteína total de la hemolinfa.
4. La lectina del langostino de agua dulce tiene un peso molecular de 14 KDa en su forma nativa; un coeficiente de sedimentación con valor de 1.4 y un punto isoeléctrico entre 5.4 y 6.1.
5. La lectina es una glicoproteína compuesta principalmente por los aminoácidos: glicina, serina, glutámico y aspártico y en su porción sacarídica por ácido siálico, galactosa, manosa, N-acetil-D-galactosamina y N-acetil-D-glucosamina.

6. Esta proteína de *M. rosenbergii* (D.) se comporta estable a un temperatura menor de 50 °C, y la actividad aglutinante no es dependiente de iones Ca^{++} y Mg^{++} .
7. Los mejores inhibidores de la lectina fueron los azúcares N-acetilados: N-sialil lactosa (α -2, 6; N-acetil-D-lactosamina (β -1, 4); y a las glicoproteínas: IgA, fetuina, mucina de la glándula submaxilar bovina así como glicoproteínas que se localizan en la membrana de los eritrocitos de rata.
8. La lectina reconoce específicamente eritrocitos de rata y conejo.
9. La presencia de ácido siálico aparentemente es un determinante importante para la lectina de *M. rosenbergii* (D.).

Estos elementos dan fundamento para continuar con los estudios del mecanismo de reconocimiento entre lo propio y no-propio para el langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (D.).

VIII. LITERATURA CITADA

1. Ratcliffe, N.A. 1989. The biological significance of immunity. Dev. Comp. Immunol. 13:273-283.
2. Lackie, A. M. 1980. Invertebrate immunity. Parasitology 80:393-412.
3. Goldstein, I.J., Hughes, R.C. Monsigny M., Osawa T. y N. Sharon. 1980. What should be called a lectin?. Nature 285:66.
4. McKay, D. y C. R. Jenkin. 1970. Immunity in the invertebrates the role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachanna bicarinatus*). Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 48:139-150.
5. Tyler, A. 1946. Natural heteroagglutinins in the body fluids and seminal fluids of various invertebrates. Biol. Bull. 90:213. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
6. Bretting, H., Kalthoff, H. y Fehr, S. 1978. Studies on the relationship between lectins from *Axinella polypoides* agglutinating bacteria and human erythrocytes. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:535-545.
7. Bretting, H., Kabat E. A., Liao J. y M. E. A. Pereira. 1976. Purification and characterization of the agglutinins from the sponge *Aaptos papillata* and a study of their combining sites. Biochemistry. 15(23):5029-5038.
8. Brown, R., Almodovar, L. R., Bhatia, H.M. y W.C. Boyd. 1968. Blood-group specific agglutinins in invertebrates. J. Immunol. 100(1):214-216.
9. Rabin, M. 1965. Studies on gaffkemia, a bacterial disease of the american lobster *Homarus americanus* (Milne Edwards). J. Invertebr. Pathol. 7:391. En: McKay, D. y C.R. Jenkin. 1969. Immunology 17:127-137.
10. Cornick, J.W. y J.E. Stewart. 1968. Interaction of the pathogen *Gaffkya homari* with natural defense mechanisms of *Homarus americanus*. J. Fish. Res. Bd. Can. 25:695. En: Hall, J.L. y D.T. Rowlands, Jr. 1974. Biochemistry. 13(4):821-827.

11. McKay, D. y C.R. Jenkin. 1969. Immunity in the invertebrates II. Adaptive immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Immunology 17:127-137.
12. Renwranztz, L. y A. Stahmer. 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. J. Comp. Physiol. 149:535-546.
13. Pauley, G.B., Krassner, S.M. y F.A. Chapman. 1971. Bacterial clearance in the California seahare *Aplysia californica*. En: Lackie, A.M. 1980. Parasitology. 80:393-412.
14. Ou, X.M., Zhang, C.F., Komano, H. y S. Natori. 1987. Purification of a lectin from the hemolymph of chinese oak silk moth. Biochemistry. 101:545-551 En: Olafsen, J. A. 1988. Am. Fish. Soc. Special. Publication 18:189-205.
15. Anderson, R.S. Phagocytosis by invertebrate cells in vitro: biochemical events and other characteristics. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:535-545.
16. Yeaton, R.W. 1981. Invertebrate lectins. II. Diversity of specificity, biological synthesis and function in recognition. Dev. Comp. Immunol. 5:535-545.
17. Tripp, M.R. 1974. Molluscan immunity. En: Lackie, A.M. 1980. Parasitology 80:393-412.
18. Olafsen, J.A. 1988. Role of lectins in invertebrate humoral defense. Am. Fish. Soc. Special Publication. 18:189-205.
19. Bang, F. 1967. Serological responses among invertebrates other than insects. Fed. Proc. 26:1680-1684. En: Cohen, E. 1968. Trans. N. Y. Acad. Sci. 30:427-443.
20. Pauley, G. B. 1974. Comparison of a natural agglutinin in the hemolymph of the blue crab, *Callinectes sapidus*, with agglutinins of other invertebrates. Contemp. Top. Immunobiol. 4:241-260.
21. Cohen, E. 1968. Immunologic observations of the agglutinins of the hemolymph of *Limulus polyphemus* and *Birgus latro*. Trans. N.Y. Acad. Sci. 30:427-443.
22. Valvassori, R. y G. A. Amirante. 1976. Caracteristiques immunoquimiques et ultrastructurales des hemocytes de *Leucophaea maderae* L. Monit. Zool. 10:403. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:535-545.

23. Amirante, G.A. y F.G. Mazzalai. 1978. Synthesis and localization of hemagglutinins in hemocytes of the cockroach *Leucophaea maderae* L. Dev. Comp. Immunol. 2:735. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:535-545.
24. Yeaton, R.W. 1980. Lectins of a north American silkmoth (*Hyalophora cecropia*): their molecular characterization and developmental biology. En: Yeaton, R. W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:535-545.
25. Akihiro, S. y S. Natori. 1989. Humoral factor activating the *Sarcophaga* lectin gene in cultured fat body Insect. Biochem. 19(3):261.
26. Amirante, G.A., G. Valle y V. Baso. 1984. Synthesis of lectins by *Squilla mantis* L. Hemocytes and the possible role of cell glycosylation in the recognition of self and non self. XVII. International Congress of Entomology. Hamburg Fed. Rep. Germ.
27. Parish, C.R. 1977. Simple model for self-non-self discrimination in invertebrates. En: Lackie, A.M. 1980. Parasitology. 80:393-412.
28. Tyson, C.J. y C.R. Jenkin. 1974. Phagocytosis of bacteria *in vitro* by haemocytes from the crayfish (*Parachanna bicarinatus*). AJERAK 52:341-348.
29. Burnet, F.M. 1974. Invertebrate precursors to immune responses. Comp. Top. Immunobiol. 4:13-24.
30. Baldo, B.A. y Uhlenbruck, G. 1975. Tridacnin, a potent anti-galactan precipitin from the hemolymph of *Tridacna maxima* (Roding). En: Lackie, A.M. 1980. Parasitology. 80:393-412.
31. Yeaton, R.W. 1981. Invertebrate lectins: I. Occurrence. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
32. Ravindranath, M.H., Higa, H.H., Cooper, E.L. y J.C. Paulson. 1985. Purification and characterization of an D-acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. J. Biol. Chem. 260(15):8850-8856.
33. Hall, J.L. y D.T. Rowlands, Jr. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. II. Specificity of agglutinin erythrocyte binding. Biochemistry. 13(4):828-832.
34. Vasta, G.R., Warr, G.W. y J.J. Marchalonis. 1983. Serological characterization of humoral lectins from the fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Dev. Comp. Immunol. 7:13-20.

35. Moscona, A. A. 1968. Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. Dev. Biol. 18:250-277.
36. Wilson, E. V.. 1907. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool. 5:245-258. En: Pauley, G.B. 1974. Contemp. Top. Immunobiol. 4:241-260.
37. Hall, J.L. y D.T. Rowlands, Jr. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinins. I purification and physicochemical characterization. Biochemistry. 13(4):821-827.
38. Noguchi, H. 1903. A study of immunization-haemolysins, agglutinins, precipitins and coagulins in cold-blooded animals. Centralbl. F. Bakt. Abt. Orig. 33:352. En: Yeaton, R. W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
39. Cantacuzene, J. 1912. Sur certains anticorps naturels observes chez *Eupagurus prideauxii*. Compt. Rend. Soc. Biol. 73:663. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
40. Cantacuzene, J. 1922. Sur le role agglutinant des urnes chez *Sipunculus nudus*. Compt. Rend. Soc. Biol. 87:259. En: Yeaton, R.W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
41. Glaser, R.W. 1918. On the existence of immunity principles in insects. Psyche. 25:39. En: Yeaton, R. W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
42. Roche, J. y Dumazert, C. 1940. Annls. Inst. Oceanogr. Paris. 20:267.
43. Tyler, A. y C.B. Metz. 1945. Natural heteroagglutinins in the serum of the lobster, *Panulirus interruptus* I. Taxonomic range of activity electrophoretic and immunizing properties. J. Exp. Zool. 100:347-387. En: Yeaton, R. W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402. Sci. 48:139-150.
44. Frentz, R. 1958. C. r. hebd. Seans. Acad. Sci. Paris. 247:2470. En: Ravindranath, , M.H., Higa, H.H., Cooper, E.L. y J.C. Paulson. 1985. J. Biol. Chem. 206 (15): 8850-8856.
- 45 Cushing, J. E. 1967. Invertebrates, Immunology and evolution Federation Proceedings. 26(6):1666-1670.
46. Weinheimer, P.F. 1971. Ph.D. Thesis. the University of Alabama, Birmingham, Ala. En: Hall, J.L. y D.T. Rowlands Jr. 1974. Biochemistry. 13(4):821-827.

47. Smith, A.C. y R.A. Goldstein. 1971. "Natural" agglutinins against sea urchin sperm in the hemolymph of the crab *Cardiosoma guanhumu*. Marine Biol. 8:6. En: Yeaton, R. W. 1981. Devel. Comp. Immunol. 5:391-402.
48. Miller, V.H. Ballback, R.S., Pauley, G.B. y S.M. Krassner. 1972. A preliminary physicochemical characterization of an agglutinin found in the hemolymph of the crayfish *Procambarus clarkii*. J. Invertebr. Pathol. 19:83. En: Yeaton, R. W. 1981. Dev. Comp. Immunol. 5:391-402.
49. Pauley, G.B. 1973. An attempt to immunize the blue crab, *Callinectes sapidus*, with vertebrate red blood cells. Experientia. 29 (2):210-211.
50. Shinozuka, T., Takei, S., Yanagida, J.L., Watanabe, H. y S. Okuma. 1988. Comparative study on the main membrane-surface sialoglycopeptides released from young and old man erythrocytes with trypsin. Comp. Biochem. Physiol. 89:309-15.
51. Seaman, G.V.F., Knox, R.J., Norot, F.J. y D.H. Reagan. 1977. Red cell aging. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. Blood. 50:1001-1011.
52. Dodge, J.T., Mitchell, C. y D.J. Hamahan. 1962. The preparations and chemical characterization of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes. Arch. Biochem. Biophys. 100:119-130.
53. Zenteno, E. y J.L. Dchoa. 1988. Isolation and purification of *Amaranthus leucocarpus* lectin on stroma column. Phytochemistry. 27:313-317.
54. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
55. Dubois, M. Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Runers, P.A. y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28:350-356.
56. Zanetta, J.P., Breckenridge, W.C. y G.J. Vincendon. 1972. Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methylglycosides as trifluoroacetic derivatives. S. Chromatography. 69:291-304.
57. Rendón, J.L. y M. Calcagno. 1985. A new plot to estimate protein molecular weight by density ultracentrifugation. Experientia 41:382-383.

58. Martin, R.G. y B. Ames. 1961. A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application to protein mixture. J. Biol. Chem. 239: 1372-1379.
59. LKB (Eds). Isoelectric Focusing Principles and methods. 1982. Pharmacia Fine Chemicals. Uppsala, Suecia.
60. Osawa, T. y L. Matsumoto. 1972. Gorse (*Ulex europaeus*) phytohemagglutinins methods in enzymology. 28 pat. B: 323-327.
61. Duchterlony, O. 1948. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 25:186. En: Elek, S.D. 1948. J. Exp. Pathol. 30:484.
62. Williams Jr. C.A. y P. Grabar. 1955. Immunelectrophoretic studies on serum proteins I. The antigens of human serum. J. Immunol. 74:158.
63. Schauer, R. 1982. Chemistry, metabolism and biological function of sialic acid. Adv. Carb. Chem. Biochem. 40:131-235.
64. Swarnakar, S., Chowdhury, P.S. y M. Sarkar. NeuGc. specific lectin from albumin gland of *Pila globosa* snail. 12th. International lectin conference. Sept. 1990. Pag.33.
65. Mandal, Ch., Biswas, M. y S. Mookerjee. A lectin which phosphoryl choline the *Achatina fulica* snail. 12th. International lectin conference. Sept. 1990. Pag. 68.
66. Gilbride, K.J. y T.G. Pistole. 1981. The presence of cooper in a purified lectin from *Limulus polyphemus*: possible new role for hemocyanin. Dev. Comp. Immunol. 5:347-352.
67. Dorai, D.T., Mohon, S., Sirmal, S. y B.K. Bachhawat. 1982. On the multispecificity of carcinoscopin, the sialic acid binding lectin from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*. En: Mandal, C. y C. Mandal. 1990. Experientia 46:433-441.
68. Hardy, S.W., Fletcher, T.C. y J.A. Olafsen. Aspects of cellular and humoral defence mechanisms in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. En: Mandal, C. y C. Mandal. 1990. Experientia. 46:433-441.
69. Ng, S.S. y J.A. Dain, En: Rosenberger A. y C.L. Schengrund (Eds.). 1976 Biological roles of sialic acid. Plenum, New York. 59-102.
70. Warren, L. 1963. Comp. Biochem. Physiol. 10:153-179. En: Schauer, R. 1982. Adv. Carb. Chem. Biochem. 40:131-235.
71. Kedzierska, B. 1978. Eur. J. Biochem. 545-552. En: Schauer, R. 1982. Adv. Carb. Chem. Biochem. 40:131-235.