

11281  
15  
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS DE INMUNIDAD EN EL  
LANGOSTINO MALAYO *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan).**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(INMUNOLOGÍA)**

**P R E S E N T A :**

*Maria Lorena*

**Ma. M. Lorena Vázquez Navarrete**

**Cd. Universitaria D.F.**

**marzo, 1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

LA INVESTIGACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS; Y EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA UNAM. BAJO LA ASESORIA DEL DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO.

ESTE PROYECTO FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (REF:N9201/D0006 Y D0009); PROGRAMA PADEP Y PAPIIT-UNAM, MÉXICO Y EL PROGRAMA UC-MEXUS (E.L. COOPER).

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. **ARTURO EDGAR ZENTENO G.** por su dirección y apoyo para la realización de la presente investigación.

Al Dr. **SERGIO ESTRADA PARRA** (Lab. de Inmunología. IPN); Dr. **FÉLIX CORDOVA ALVA** (Depto. de Bioquímica, Fac. Medicina. UNAM); Dra. **NORA GALINDO MIRANDA** (Lab. de Morfofisiología Animal, Fac. de Ciencias. UNAM); Dra. **PILAR TORRES GARCÍA** (Lab. de Invertebrados, Fac. de Ciencias. UNAM); Dr. **ARMANDO PÉREZ TORRES** (Lab. de Biología Celular y Tisular, Fac. de Medicina. UNAM) y Dr. **RAÚL CHÁVEZ SÁNCHEZ** (Lab. de Bioquímica de la Fac. de Medicina. UNAM), por sus valiosas sugerencias al manuscrito.

A la Dra. **MARIA LUISA FANJUL DE MOLES** (Lab. Morfofisiología Comparada) y al Dr. **RUBÉN DARIO MARTÍNEZ PÉREZ** (Sub. Div. de Medicina Experimental, Fac. Medicina. UNAM), por sus sugerencias durante el trabajo de investigación.

De manera especial agradezco al Dr. **ARMANDO PÉREZ T.** y a su grupo de colaboradores M.C. **DIANA MILLÁN A.** y M.C. **MARTHA USTARROZ F.** por su amistad y apoyo para la culminación del presente trabajo de tesis y publicaciones. Así como a la Dra. **NORA GALINDO M.** por sus acertadas sugerencias al manuscrito.

Al Dr. **JOSÉ LUIS VILLALOBOS HIRIART** (Lab. de Carcinología del Instituto de Biología UNAM), por su apoyo del material bibliográfico en la Taxonomía del grupo de los crustáceos.

Al Dr. **EDWIN L. COOPER** (Departamento de Anatomía y Biología celular de la UCLA Medical Center, L.A. California) y al Dr. **GARY MARTIN** (Departamento de Biología, Occidental College, L.A. California) por su apoyo en el material bibliográfico y asesoría para el manejo de hemocitos.

Finalmente agradezco a la Dra. **CONCEPCIÓN AGUNDIS MATA**; Dra. **MARÍA GUADALUPE MALDONADO MERCADO**; Dr. **RICARDO LASCURAIN LEDEZMA**; (Lab. de Bioquímica, Fac. de Medicina UNAM) y a la M.C. **PATRICIA ROSAS MEDINA** (Lab. de Bioquímica, INER) por su apoyo y sugerencias durante la realización del trabajo de investigación.

## CONTENIDO

	<u>página</u>
Resumen .....	7
Introducción .....	9
objetivos .....	11
Antecedentes .....	13
- Mecanismos de Inmunidad en invertebrados .....	14
- Coagulación (gelación del plasma) .....	17
- Fagocitosis .....	18
- Encapsulación y formación de Nódulos .....	20
- Activación del Sistema de la Profenoloxidasa (proPO) .....	21
- Reconocimiento de lo no propio .....	23
- Características fisicoquímicas de la lectina del langostino	
<i>M. rosenbergii</i> .....	25
Material y Métodos .....	29
- Obtención de especímenes .....	29
- Purificación de la lectina sérica .....	30
- Estudio morfológico de los hemocitos del langostino .....	30
- Monocapa de hemocitos adherentes para ensayos de fagocitosis...	33
- Marcaje de carbohidratos de superficie .....	35
- Obtención de patógenos del langostino .....	37
- Reconocimiento de lo no propio por la lectina serica .....	38
Resultados .....	40
- Clasificación de los hemocitos .....	40
- Actividad Fagocítica .....	43
- Especificidad de la actividad fagocítica por carbohidratos .....	44
- Caracterización histoquímica de carbohidratos de la superficie	

de los hemocitos .....	45
- Reconocimiento de lo no propio por la lectina .....	46
Discusión .....	48
Perspectivas .....	56
Conclusiones .....	60
Referencias .....	62
Artículos elaborados:	
- Morphological analysis of hemocytes from the freshwater prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i> . Vázquez L., A Pérez-Torres, D. Millán, G. Agundis, G. Martin, E. Cooper and E. Zenteno. Developmental Comparative Immunology. (en preparación) .....	69
- Participation of the lectin from freshwater prawn <i>Macrobrachium rosenbergii</i> hemocytes in the recognition of non-self cells. Vázquez L., G. Maldonado, C. Agundis, A. Pérez-Torres, E.L. Cooper and E. Zenteno. Journal of Experimental Zoology. (enviado). .....	95
- Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from <i>Macrobrachium rosenbergii</i> . Vázquez L., L. Jaramillo, R. Lascurain, E. Cooper, P. Rosas and E. Zenteno. Comparative Biochemistry and Physiology (1996, en prensa) .....	118

## RESUMEN

Las lectinas se encuentran presentes en la hemolinfa de diversas especies de invertebrados. Estas proteínas aparentemente son sintetizadas por los hemocitos, sugiriendo por lo tanto que pueden funcionar como opsoninas dado que llegan a reconocer y a enlazar específicamente a los carbohidratos de membrana o ser utilizadas como marcadores de los hemocitos de la propia especie. Por estudios realizados en el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan), hemos identificado y caracterizado una lectina sérica de 19 kDa que reconoce ácido siálico, carbohidratos N-acetilados y aglutina únicamente a los eritrocitos de rata y conejo. El presente trabajo se realizó con la finalidad de clasificar los tipos de hemocitos circulantes del langostino malayo *M. rosenbergii* (DeMan) e identificar el papel de la lectina sérica como mediador del mecanismo de reconocimiento de antígenos en estos organismos, lo cual también contribuye a un conocimiento básico sobre la inmunología de los invertebrados así como a diversas áreas de la biología celular, morfofisiología, diagnóstico patológico y evolución de la respuesta inmune de los crustáceos.

En el curso de nuestras investigaciones identificamos dos especies bacterianas que dañan la cutícula del langostino y que son aglutinadas por la lectina sérica, la cual mediante ensayos de inhibición determinamos que esta proteína reconoce a los carbohidratos N y O acetilados de la pared bacteriana. La actividad fagocítica de los hemocitos circulantes del langostino malayo, está mediada por un pequeño grupo de células que poseen escasos o abundantes gránulos citoplasmicos. Nuestros resultados nos permiten proponer que el reconocimiento de lo no propio está determinado por dos mecanismos independientes: uno que posee especificidad por el ácido 9,8,7-O- acetil siálico y azúcares N-acetilados (especificidad similar a la de la lectina sérica), ya que existe una mayor preferencia de los hemocitos con actividad fagocítica hacia los eritrocitos de rata y conejo, que poseen dichos carbohidratos en su superficie; el segundo mecanismo de defensa podría estar dado de manera inespecífica, con



base en que los hemocitos también manifiestan actividad fagocítica, aunque en menor proporción hacia los eritrocitos de diversas especies de vertebrados (humanos, cerdo y caballo).

## INTRODUCCIÓN

Los estudios realizados sobre la inmunidad en moluscos, insectos y crustáceos<sup>(1-3)</sup> están dirigidos a identificar los eventos celulares y la naturaleza molecular de los factores séricos, que se desencadenan en presencia de los microorganismos patógenos. Los mecanismos de defensa más importantes que se han identificado en los invertebrados son: 1. la degranulación, la cual da lugar a la liberación y activación de sistemas enzimáticos<sup>(4,5)</sup>; 2. la actividad fagocítica<sup>(6)</sup>; 3. la formación de nódulos y la encapsulación<sup>(7,8)</sup> y 5. la síntesis de factores séricos<sup>(9)</sup>. Coombe y cols.<sup>(10)</sup> han propuesto que la respuesta a tales eventos de inmunidad se basa en la interacción molecular entre los factores sérico y los receptores de superficie celular no propios, o bien entre los receptores de superficie celular (propio y no propio).

La clasificación propuesta por investigadores como Hose y cols.<sup>(11)</sup>, y Lanz y cols.<sup>(12)</sup> para la identificación morfológica de los hemocitos circulantes y su función, establecidas para la langosta americana *Homarus americanus* H. Milne, la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall), el camarón decorador *Loxorhynchus grandis* Stimpson y para el acocil *Procambarus clarkii* (Girard), las cuales no son del todo aplicables para otras especies del grupo de los crustáceos dulceacuícolas, por esta razón existen controversias en los diversos procesos celulares y bioquímicos que intervienen en los mecanismos inmunológicos.

De las moléculas séricas de mayor relevancia a nivel evolutivo, las lectinas tienen una mención especial para los crustáceos<sup>(13-16)</sup>, debido a su participación en el reconocimiento de lo no propio. Esto forma parte de un mecanismo primario de reconocimiento entre células propias de especies primitivas del reino animal tal como lo son las esponjas<sup>(16,17)</sup>. Las lectinas son moléculas con especificidad por los carbohidratos que conforman la superficie de las células, y por tal motivo su función podría ser también la de participar en la actividad fagocítica y modular la

estimulación de las reacciones séricas y celulares del organismo; participar en los procesos endocrinos de regulación; en el reconocimiento de lo no propio; y en la opsonización<sup>(16)</sup>. Por otra parte, dada las funciones propuestas para las lectinas, se han considerado por Wu y Kabat<sup>(18)</sup> que estas moléculas podrían tener una evolución convergente con las inmunoglobulinas.

Las lectinas en los invertebrados se pueden encontrar asociadas a membranas celulares o disueltas en la hemolinfa<sup>(15)</sup>. Las lectinas de los crustáceos: cangrejo coco *Birgus latro* (Linnaeus)<sup>(19)</sup>, cangrejo nadador *Callinectes danae* Smith<sup>(20)</sup>, cangrejo roca *Cancer antennarius* Stimpson<sup>(21)</sup> y la langosta americana *H. americanus* H. Milne<sup>(22)</sup>, están dirigidas principalmente hacia estructuras complejas de carbohidratos, generalmente hacia los que contienen ácido siálico. La actividad biológica de las lectinas aisladas de algunas especies de invertebrados como la de los xifosuros *Limulus polyphemus* (Linn)<sup>(19)</sup> y *Carcinoscorpius rotunda-cauda*<sup>(23)</sup> son dependientes de calcio. De acuerdo a Drickamer<sup>(24)</sup> estas proteínas son denominadas lectinas C (dependientes de cationes divalentes). En algunas especies de decápodos como en el cangrejo australiano *Parachaeraps bicarinatus*<sup>(25)</sup>, se ha demostrado que la presencia de la lectina incrementa la actividad fagocítica, ya que éstas pueden funcionar como moléculas de adhesión, desencadenando, por lo tanto, la actividad fagocítica u otro evento celular como es la formación de nódulos y la encapsulación<sup>(26)</sup>. Por esto, se consideran a éstas moléculas como parte del factor principal que modula la reacción inmune en los invertebrados. Por otro lado, Bang<sup>(27)</sup>, ha postulado que las lectinas libres en el suero del centollo europeo *Maja esquinado* (Herbst), además de participar en el reconocimiento de lo no propio también podrían participar en ciertos eventos fisiológicos como es la transmisión de señales y en el transporte de calcio y carbohidratos para la formación del exoesqueleto.

En el Estado de Morelos el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan), es la especie de mayor importancia económica para los centros de explotación acuícola. Los monitoreos de sanidad acuícola en otros países dedicados al cultivo

y engorda del langostino como Thailandia y Hawaii (USA), han revelado que en los diferentes estadios de desarrollo de esta especie pueden ser afectados por microorganismos patógenos enzoóticos como: Rickettsias, virus (parvo-like virus = MHPV), bacterias quitinolíticas y filamentosas (*Vibrio* sp, *Beneckea* sp. *Pseudomonas* y *Aeromonas* sp.), micobacterias (*Mycobacterium* sp.), los protozoarios (*Epistylis*, *Zoothamnium*, *Lagenophrys* sp. y *Vorticella*), hongos (*Lagenidium callinectes*, *Sirolopidium* sp. *Fusarium* y Tricomictos), insectos (huevecillos de *Ramphocorixa acuminata*), el tremátodo (*Carneophallus choanophallus*), el nemátodo (*Angiostrongylus cantonensis*) y el isópodo (*Probopyrus* sp.), los cuales pueden llegar a causar merma en la producción<sup>(28,29)</sup>.

#### OBJETIVO GENERAL.

Considerando la importancia que presentan los hemocitos circulantes en los mecanismos de defensa, así como la participación de la lectina en el reconocimiento de lo no propio, se propuso realizar en este trabajo la identificación de los eventos de defensa que se manifiestan en los crustáceos, particularmente del langostino de agua dulce *M. rosenbergii* (DeMan), también conocido como langostino malayo, camarón gigante, langostino asiático o camarón de agua dulce. La tolerancia de esta especie para su manejo en cultivo y su resistencia a las variaciones de los principales parámetros ambientales, hacen a esta especie atractiva para el desarrollo acuícola y su comercio a nivel mundial. Por lo tanto se ha considerado una especie de importancia para el desarrollo acuícola en el estado de Morelos.

### Objetivos particulares.

1. Realizar un estudio morfológico de los hemocitos circulantes del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan) y su clasificación.
2. Determinar el tipo de hemocito que lleva a cabo la actividad fagocítica.
3. Identificar la presencia de la lectina sérica en los diferentes tipos de hemocitos del langostino de agua dulce.
4. Identificar las especies de bacterias patógenas para el langostino, presentes en la zona de explotación acuícola "El Huamuchil", Jojutla: Morelos.
5. Establecer si existe el reconocimiento de la lectina sérica del langostino de agua dulce, hacia las especies de bacterias patógenas para esta especie, así como para otras especies de bacterias patógenas para vertebrados.

## ANTECEDENTES

La inmunidad es un proceso de defensa que se activa específicamente en un organismo ante la presencia de microorganismos patógenos o de moléculas extrañas genéticamente<sup>(30)</sup>. Los diversos estudios realizados sobre los mecanismos de inmunidad llevados a cabo en esponjas, celenterados, artrópodos, anélidos, moluscos y equinodermos<sup>(2,16)</sup>, nos demuestran que todas las formas de vida han creado un sistema inmunológico para protegerse contra microorganismos patógenos o parásitos. En particular Ratcliffe<sup>(2)</sup>, menciona que la inmunidad de los crustáceos, como en los vertebrados, está dada por una cooperación de procesos celulares y humorales. Sin embargo, el sistema inmunológico de los invertebrados se caracteriza por la carencia de una especificidad y memoria, funciones que son realizadas por las inmunoglobulinas en los vertebrados y células linfoides con receptores de superficie para la identificación de los antígenos de histocompatibilidad (MHC) y otras moléculas de superficie como el CD4, CD8 y Thy1<sup>(30)</sup>.

Hildemann<sup>(31)</sup>, menciona que la presencia del caparazón o exoesqueleto en los crustáceos, constituye la primer barrera de protección ante la constante amenaza de patógenos. En cuanto al sistema vascular McMahon y Burnett<sup>(32)</sup> mencionan, que esta conformado por la hemolinfa (fluido corporal constituido por el suero que transporta nutrientes, proteínas, hormonas), y los hemocitos (células circulantes), que participan en la eliminación de patógenos y colaboran de manera importante en la restauración de tejidos dañados. El flujo sanguíneo del corazón, se dirige de atrás hacia adelante llegando por medio de las arterias y los vasos sanguíneos a irrigar a los tejidos y músculos.

## MECANISMOS DE INMUNIDAD EN INVERTEBRADOS

Con relación a los eventos bioquímicos que se desencadenan en la inmunidad de los crustáceos estos son escasamente conocidos. Sin embargo, se conoce que la respuesta celular se manifiesta en cooperación con factores séricos.

A nivel celular, Amirante<sup>(33)</sup> y Smith y Söderhäll<sup>(34)</sup>, mencionan que la actividad biológica de cada tipo de hemocito juega un papel importante en las diferentes reacciones de defensa contra parásitos y patógenos o microorganismos no patógenos que podrían entrar al hemocele a través de un daño en la cutícula, siendo los hemocitos de poditos branquiales, los responsables para remover las proteínas extrañas y quizás virus de la circulación, y por lo tanto la presencia de los hemocitos en dichas estructuras son consideradas primordiales en el mecanismo de defensa.

Los estudios sobre la clasificación de los tipos de hemocitos circulantes y su actividad biológica mediante marcaje citoquímico se han descrito ampliamente en la langosta americana *H. americanus* H. Milne, la langosta roja *P. interruptus* (Randall), el camarón decorador *L. grandis* Stimpson<sup>(11)</sup> y en el acocil *P. clarckii* (Girard)<sup>(12)</sup>. De manera general, estos autores han clasificado a los hemocitos en: 1) los hemocitos hialinos.- caracterizados básicamente por la escasa presencia de gránulos citoplasmicos, rara presencia de lisozimas y carencia de fagosomas; mediante observaciones y ensayos citoquímicos se ha considerado que este grupo de células inician la coagulación al sufrir la autólisis; y 2) los hemocitos granulares, llamados también granulocitos, generalmente no muestran cambios morfológicos durante la coagulación y, son subdivididos en dos subtipos: el primer subtipo de hemocitos comprende a las células con numerosos pequeños gránulos citoplasmicos, éstas células se caracterizan por presentar pseudópodos largos y delgados en su mayoría cuando son adheridos, al parecer son células que participan en el reconocimiento de partículas extrañas. El segundo subtipo incluye a los hemocitos con gránulos citoplasmáticos grandes y numerosos, un núcleo

pequeño y una escasa relación nucleo-citoplasma, este grupo raramente presenta pseudópodos y, su función se ha sugerido que está dirigida a la encapsulación de patógenos y a la cicatrización de heridas. Hose y cols.<sup>(11)</sup> y Tsing y cols.<sup>(35)</sup> hacen referencia sobre la gran heterogeneidad que existe en el número y tamaño de gránulos, lo que ha dado lugar a Bodammer<sup>(36)</sup> a proponer que esta variabilidad esta dada por una progresiva maduración celular. Por otra parte, con la finalidad de uniformizar los criterios para la clasificación y conteo de los hemocitos Williams y Lutz<sup>(37)</sup>, han propuesto el considerar también, ciertos factores fisiológicos de la especie como son: el estadio de desarrollo y el grado de maduración gonádica.

Entre los trabajos más relevantes sobre la caracterización fisicoquímica de las proteínas séricas de crustáceos, se han caracterizado a las lectinas de las siguientes especies: *Birgus latro* (Linnaeus)<sup>(19)</sup>, *Callinectes danae* Smith<sup>(20)</sup>, *Cancer antennarius* Stimpson<sup>(21)</sup>, *Homarus americanus* H. Milne<sup>(22)</sup> y *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan)<sup>(38)</sup>. Las propiedades fisicoquímicas de estas proteínas se citan más adelante (página 24).

Los diversos mecanismos de defensa humoral y celular que se manifiestan en el grupo de los crustáceos se resumen en la Tabla 1, posteriormente se realiza una amplia descripción de cada evento inmunológico.



Tabla 1. MECANISMOS Y MEDIADORES QUE PARTICIPAN EN LA INMUNIDAD DE LOS CRUSTÁCEOS.

Mecanismo de inmunidad	Respuesta Celular	Respuesta Humoral (Cooperación de factores plasmáticos).
- Coagulación (gelación del plasma) (Ref. 39,40,41)	Células hialinas	Coagulógeno, Serin protesa
- Fagocitosis (Ref. 5,6,42-47)	Células hialinas Células semigranulares	Factores de adhesión
- Encapsulación (Actividad de la proPo) (Ref. 7,8,49y50)	Células semigranulares	Bactericidas Fungicidas Actividad de adhesinas
- Formación de Nódulos (Actividad de la proPo) (Ref. 7,8,49y50)	Células granulares	Bactericidas Fungicidas Adhesina
- Activación del Sistema de la Profenoloxidasa (proPo) (Ref. 49,51y52)	Células semigranulares Células granulares	Bactericidas Fungicidas Adhesinas
- Reconocimiento de lo no propio (Ref. 14,38,53-58)	Receptores de membrana	Lectinas Factores séricos

## COAGULACIÓN (gelación del plasma)

En los crustáceos, Martin y cols.<sup>(39)</sup> consideran que la coagulación de la hemolinfa es una respuesta esencial de defensa, que previene inmediatamente la pérdida de hemolinfa y la diseminación de patógenos a través del cuerpo al ser dañado el exoesqueleto. Estos autores, han determinado que los diferentes procesos de la gelación del plasma en los crustáceos, se establece de acuerdo al porcentaje de hemocitos hialinos circulantes: para el Tipo A, que se caracteriza por una rápida aglutinación de los hemocitos sin la gelación del plasma, se manifiesta en las especies que comprenden menos del 30% de hemocitos hialinos (por ejemplo en especies de cangrejos); mientras que el Tipo B, involucra la agregación de células acompañada por una limitada gelación del plasma; y el Tipo C, va a presentarse en las especies con más del 50% de células hialinas y, la autólisis de estos hemocitos van a causar la coagulación del plasma y una agregación celular (generalmente manifestada en camarones). Por otra parte, Omori y cols.<sup>(40)</sup> han observado que tanto la intensidad como el tiempo de la gelación también varían de acuerdo a la concentración de coagulógeno que se presente en los diferentes estados de desarrollo y de igual manera en el porcentaje de los tipos de hemocitos circulantes. En el camarón de piedra del pacífico *Scicyonia ingentis* (Burkenroad), el cangrejo *L. grandis* Stimpson y el acocil *P. clarkii* (Girard)<sup>(39)</sup>, se ha determinado que durante el proceso de la gelación del plasma se encuentran factores plasmáticos como el coagulógeno, una lipoproteína de 400 kDa (con subunidades de 180-200 kDa). Sin embargo, aún se desconoce el lugar de síntesis del coagulógeno plasmático.

**Activación de la enzima proaglutinante.**- El grupo de las serin-proteasas han sido consideradas por Durliat<sup>(41)</sup>, como enzimas plasmáticas proaglutinantes, que pueden ser activadas por dos vías independientes: 1) la presencia de los Lipopolisacáridos (LPS) generalmente presentes en la pared celular de bacterias Gram negativas o bien, 2) por la estimulación de la  $\beta$ 1,3 glucana de la pared celular de ciertos hongos y algas. Una vez activada, esta enzima coagulógena se

convierte en polímeros de coagulina enlazados covalentemente por la acción de la proteína transglutaminasa, que es un polímero heterogéneo dependiente de iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Existen algunas formas catalíticamente inactivas de las serin-proteasas o como se tratará mas adelante de fenoloxidasas, en los gránulos de hemocitos granulares. Esta última enzima al ser activada por la serin-proteasa induce una rápida degranulación de dichos hemocitos, obteniéndose como resultado la gelificación, melanización (producto de la descarboxilación enzimática) y la producción de compuestos antimicrobianos. Por otra parte, también se ha propuesto que las proteínas liberadas por lisis de hemocitos, incluyendo la fenoloxidasa, pueden ser proteínas con actividad opsónica, además de participar en el sistema de reconocimiento de lo no propio.

## FAGOCITOSIS

La fagocitosis es un proceso desarrollado por células individuales que permiten la ingestión de partículas pequeñas, tales como bacterias o protozoarios. En el grupo de los crustáceos, Bayne<sup>(6)</sup> cita que los hemocitos con actividad fagocítica han recibido una considerable atención por ser las células mediadoras de la inmunidad y llevar a cabo la eliminación tanto de microorganismos como de restos celulares. Estas células fagocíticas pueden encontrarse libres en el hemocele, fijas sobre la superficie exterior de arteriolas, en los espacios hemáticos del hepatopáncreas y/o en las branquias. Experimentos *in vitro* realizados por Tyson y Jenkin<sup>(42)</sup>, Goldenberg y cols.<sup>(43)</sup> y Paterson y cols.<sup>(44)</sup>, han demostrado que los hemocitos de diferentes especies de crustáceos fagocitan eritrocitos de mamíferos y bacterias de diversas cepas. Los fagocitos libres del cangrejo australiano *P. bicarinatus*, del cangrejo del arrecife *Ozius truncatus*<sup>(37)</sup> y de la langosta americana *H. americanus* H. Milne<sup>(44,45)</sup>, reconocen partículas extrañas como los eritrocitos de carnero, diferentes células tumorales y bacterias

Gram negativas como *Pseudomonas* y *Escherichia coli*. Por otra parte, los hemocitos de la langosta americana *H. americanus* H. Milne tienen la capacidad de fagocitar bacterias Gram negativas (*Gaffkya homari*)<sup>(46)</sup>, pero no a bacterias Gram positivas las cuales se multiplican en el interior del organismo. En cuanto a los fagocitos fijos en las branquias del cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathbun se ha observado que son capaces de eliminar tanto a las bacterias Gram negativas (marinas) como a las Gram positivas (*Aerococcus viridans*)<sup>(47)</sup>.

Estos sistemas *in vitro*, han permitido evaluar la participación de ciertos factores séricos o glicoproteínas de membrana celular, en el desarrollo de una actividad fagocítica eficiente. Experimentos realizados en el cangrejo australiano *P. bicarinatus*, han establecido que los fagocitos presentan sobre su membrana factores de reconocimiento dirigidos hacia los componentes de lipopolisacáridos (LPS) del antígeno somático "O" de *Salmonella abortus equi*<sup>(42)</sup>. En otros experimentos realizados en el acocil *Pacifastacus leniusculus* (Dana) y el cangrejo natante europeo *Carcinus maenas* (Linnaeus) por Söderhäll y cols.<sup>(6)</sup>, demostraron que las bacterias de *Moraxella* NCMB 308, previamente tratadas con laminarina ( $\beta$ 1,3-glucana aislada de la pared celular de hongos) eran fagocitadas más fácilmente, que aquellas bacterias previamente tratadas con otro tipo de sustancias como carbohidratos y sus polímeros (glucosa, dextrán, celulosa o quitina). Por lo anterior, se han propuesto mecanismos para el control de una reacción inmune multicelular *in vivo*, que actúen directamente con los hemocitos o bien a través de algún mecanismo indirecto, como lo sugieren los experimentos realizados por Itami y Takahashi<sup>(48)</sup>, sobre la sobrevivencia de las larvas del camarón tigre gigante *Penaeus mondon* Fabricius, que al ser alimentadas con dietas que contenían bacterias inactivas de *Vibrio* sp., desarrollan una resistencia mayor a la infección bacteriana que la mostrada por el grupo control que no fue previamente sensibilizado.

## ENCAPSULACION Y FORMACIÓN DE NÓDULOS

La encapsulación y la formación de nódulos son considerados como una respuesta de tipo multicelular, para la eliminación de partículas u objetos extraños que no pueden ser fagocitados o destruidos por los mecanismos humorales. Tienen como finalidad de dar muerte a los patógenos o bien, restringir su movimiento y crecimiento en el hemocele de estos invertebrados<sup>(8)</sup>.

Ensayos *in vitro* realizados por Persson y cols.<sup>(8)</sup>, en el astaco *Astacus leptodactylus* Eschscholtz para identificar los mecanismos de la encapsulación, han demostrado la participación de los hemocitos semigranulares así como de factores adhesivos que estimulan la formación de agregados celulares llamadas cápsulas, alrededor de un gran número de partículas extrañas mayores de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, tales como esporas de hongos o hifas de *Aspergillus niger*. Johanson y Söderhäll<sup>(49)</sup>, observaron que este proceso es activado cuando las células semigranulares son lisadas al entrar en contacto con el objeto extraño, provocándose así la degranulación de las células y la activación del sistema de la profenoloxidasa, que tiene como resultado la liberación de factores de adhesión y estimular la migración de nuevas células para la formación de agregados celulares, favoreciendo la liberación de productos tóxicos que dan muerte a los patógenos. Entre los mecanismos de regulación de este fenómeno, Söderhäll y cols.<sup>(7)</sup> mencionan que el crecimiento de la cápsula va a depender de la concentración de los factores de degranulación, los cuales, gradualmente, decrecen en concentración hacia la periferia de la cápsula. Una cápsula típica consiste de 5 a 30 capas de hemocitos compactos con escaso o nulo espacio intercelular. El aspecto morfológico de la cápsula en las diferentes especies presenta variaciones relativamente menores, como la extensión de las células aplanadas, necrosis celular, presencia o ausencia de melanina y la cantidad de material extracelular. Ratner y Vinson<sup>(50)</sup>, han demostrado que los hemocitos que participan en la encapsulación contienen mucopolisacáridos ácidos o neutros y

glicoproteínas. Teóricamente la muerte del organismo encapsulado va a estar dada por la disminución en la concentración de oxígeno, destrucción (por la participación de hidrolasas) o la acción tóxica de quinonas. Por otra parte, también se ha citado que la formación de nódulos implica un aglomerado de células que van a envolver a parásitos de mayor tamaño como helmintos o esporas de hongos, e incluso la participación de factores de adhesión y cohesión que llegan a formar una masa sólida alrededor del patógeno.

### ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE LA PROFENOLOXIDASA (proPO)

La fenoloxidasa (PO) es una enzima bifuncional que contiene cobre, y que cataliza la O-hidroxilación de monofenoles y la oxidación de difenoles a quinonas<sup>(49)</sup>. En los crustáceos se ha citado por Johansson y Söderhäll<sup>(49)</sup>, que la PO se encuentra presente como proenzima (precursor inactivo), la cual puede localizarse en la hemolinfa o en los gránulos de células sanguíneas de artrópodos. Activada esta enzima, es capaz de convertir la tirosina a DOPA y la DOPA en DOPA-quinona, siendo el último producto espontáneo de la reacción no enzimática la "melanina", pigmento pardo-negro, al cual se le han adjudicado ciertas propiedades biológicas, tales como la inhibición de precursores de enzimas bacterianas y fungicidas.

Johanson y Söderhäll<sup>(49)</sup>, también consideran que la degranulación o exocitosis de los hemocitos es un evento importante en ciertos mecanismos de defensa, como es la activación del sistema de la profenoloxidasa (proPO). Ensayos realizados por Johansson y Söderhäll<sup>(61)</sup> sobre la actividad del Sistema de la proPO en el acocil *P. leniusculus* (Dana), han demostrado que este sistema se encuentra relacionado de manera específica con la exocitosis de hemocitos semigranulares, efecto provocado por la presencia de los lipopolisacáridos (LPS) o la  $\beta$ -1,3-glucana (carbohidratos de la pared celular de bacterias Gram negativas

y hongos). Estudios posteriores sobre la caracterización química de la proenzima fenoloxidasa en los hemocitos del acocil *P. leniusculus* (Dana), revelan que es una glicoproteína de 300 kDa, la cual en forma nativa se presenta como un terámero, con punto isoeléctrico cercano a 5.4 y un contenido de cobre de 0.16% aproximadamente, lo cual corresponde a dos átomos de cobre por molécula<sup>(52)</sup>. El camino por el cual es activado el sistema de la proPO es complejo. Johansson y Söderhäll<sup>(49)</sup>, refieren que tal evento comprende una reacción enzimática en cascada en la que participa, por lo menos, una serin-proteasa y que produce junto con otras proteínas, al "factor de adhesión" que es un material pegajoso, el cual cubre a los microorganismos invasores. También son liberados otros factores como: 1) el "factor promotor de la degranulación", provocando la lisis y exocitosis de células semigranulares lábiles; 2) el "factor promotor de la encapsulación" que es capaz de provocar la agregación de células, y 3) ciertas proteínas que actúan como opsoninas de fagocitos (Figura 1).

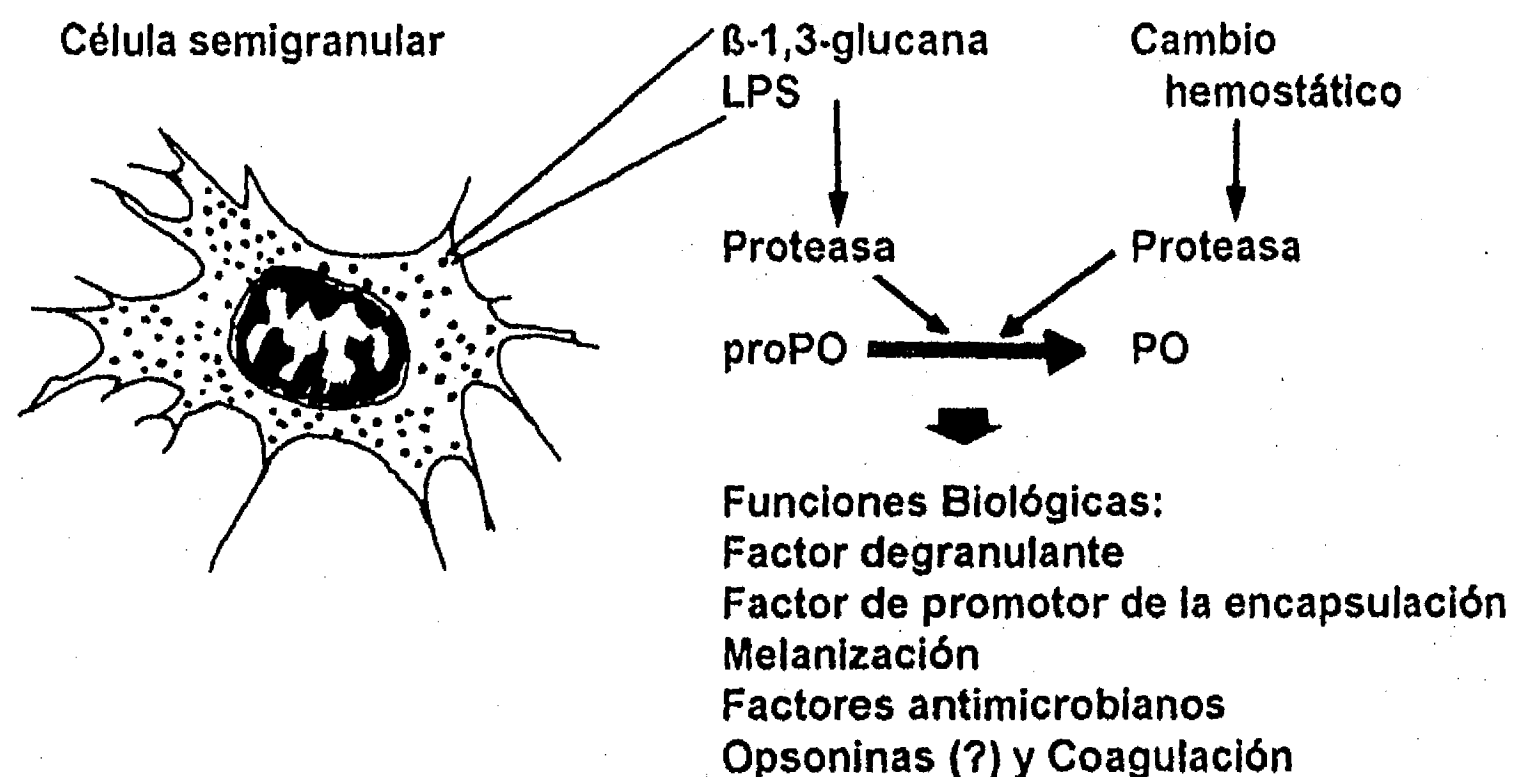


Figura 1. Comunicación celular en el mecanismo de defensa en crustáceos. Al reconocer a las partículas extrañas se provoca la degranulación y activación del sistema de la profenoloxidasa (proPO) (modificado de Johansson y Söderhäll<sup>(49)</sup>).

## RECONOCIMIENTO DE LO NO PROPIO

Como un factor humoral en los invertebrados, las lectinas han llamado la atención por tener la habilidad de interactuar con microorganismo incluyendo bacterias, hongos y levaduras<sup>(53)</sup>. Hunt<sup>(54)</sup> y Renwranz<sup>(55)</sup>, han reportado que tanto la especificidad como el título de actividad aglutinante de las lectinas varia entre las diferentes especies de los crustáceos y, tal especificidad puede estar dirigida ya sea hacia un residuo sacarídico o hacia una estructura compleja. Dada la especificidad que presentan las lectinas hacia carbohidratos de superficie de membrana, se ha propuesto que estas moléculas están involucradas en el reconocimiento de lo propio y lo no propio, permitiendo la agregación de patógenos o bien asociarla con las señales metabólicas de los organismos. Olafsen<sup>(14)</sup>, hace énfasis sobre la importancia de la caracterización química y especificidad de las lectinas para comprender la arquitectura molecular en la activación y el reconocimiento de estas proteínas, así como su relación a otros eventos moleculares involucrados en la protección inmunológica y del éxito para el desarrollo de estos organismos.

Las lectinas están presentes en el suero de varias especies de crustáceos como en el cangrejo coco *B. latro* (Linnaeus)<sup>(19)</sup>, en la langosta americana *H. americanus* H. Milne<sup>(22)</sup> y en el langostino malayo *M. rosenbergii* (DeMan)<sup>(38)</sup> o bien, asociadas a la membrana celular como en los hemocitos del esquilla *Squilla mantis* (Linnaeus)<sup>(56)</sup> y del cangrejo azul *C. sapidus* Rathbun<sup>(57)</sup>. Lo cual ha dado lugar a Renwranz<sup>(55)</sup> para proponer que los hemocitos son el lugar de síntesis de estas proteínas, permaneciendo algunas de estas sobre la superficie celular, mientras que otras son liberadas al suero. Ensayos *in vitro* realizados por Tyson y Jenkin<sup>(42)</sup> y McKay y Jenkin<sup>(25)</sup>, determinaron que las lectinas séricas favorecen el incremento de la actividad de los fagocitos hacia bacterias y eritrocitos de vertebrados, esto dado por la especificidad, la cual es esencial para el reconocimiento y susceptibilidad para ser ingeridos. También, estos autores



tienen evidencias de que tanto las bacterias como eritrocitos previamente tratados con suero son fácilmente enlazados por los hemocitos, llevándose a cabo una fagocitosis eficiente. La especificidad de las lectinas, particularmente las que se han aislado de crustáceos está dada principalmente hacia los azúcares N-acetilados, entre los que se encuentran la N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y el ácido N-acetil-neuramínico (Tabla 2).

Tabla 2. ESPECIFICIDAD DE LAS LECTINAS DE CRUSTÁCEOS HACIA ESTRUCTURAS CARBOHIDRATO

Especie	Carbohidrato	Referencia
<i>Birgus latro</i> (L.)	NeuAc	19
<i>Callinectes danae</i> S.	NeuAc, GlcNAc; GalNAc, ManNAc, D-Gal	20
<i>Cancer antennarius</i> S.	NeuOAc (9-O-acetil); (4-O-acetil)	21
<i>Homarus americanus</i> H.	NeuAc, ManNAc; GlcNAc, D-Glc.	22
<i>Macrobrachium rosenbergii</i> (D.)	NeuAc, GlcNAc, GalNAc	38

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

## CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA LECTINA DEL LANGOSTINO *M. rosenbergii* (DeMan)

En nuestros estudios previos<sup>(38)</sup> sobre la caracterización química de la lectina sérica, reportamos que es una glicoproteína de 19 kDa en su forma nativa; es homodimérica y está compuesta de dos unidades de 9.6 kDa; presenta un punto isoeléctrico con un rango de 5.4 a 6.1; y un coeficiente de sedimentación de 1.4. Así mismo reportamos que su porción protéica está compuesta principalmente por los aminoácidos glicina, serina, aspargina, encontrándose también residuos de cisteína y el 7% del peso total de la lectina corresponde a carbohidratos (Tabla 3). En cuanto a su especificidad, mediante ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante, determinamos que está dirigida hacia los grupos 9-O-acetil siálico y principalmente al ácido neuramínico  $\alpha$  2,3; N-acetilgalactosamina  $\alpha$  1,0 Serina/Treonina, presente en grandes cantidades en la mucina submaxilar bovina (Tabla 4). El hecho de que la lectina reconozca estructuras sacarídicas que poseen al derivado O-acetilado del ácido siálico, permitió comprender su propiedad de aglutinar de manera específica a los eritrocitos de rata y conejo, ya que estas células contienen dicho residuo en altas proporciones (concentración mayor al 20 % del total del ácido siálico); mientras que los eritrocitos que poseen otros derivados del ácido siálico no son aglutinados (Tabla 5). La actividad aglutinante de la lectina sérica del langostino depende de  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$ . Finalmente, la lectina sérica de *M. rosenbergii* (DeMan) no es capaz de estimular la actividad mitogénica en presencia de linfocitos murinos o de rata.

Tabla 3. Características Fisicoquímicas de la lectina de *M. rosenbergii*<sup>(38)</sup>.

Peso molecular	19 kDa
Estado nativo	Dímero
	9.6 kDa c/unidad
pI	5.4-6.1
S <sub>20,w</sub>	1.4
Aminoácidos	principalmente: Gly, Ser, Glx y Asx
	1 Cys
Carbohidratos	7% por peso
	NeuAc, Gal, Man, GlcNAc, GalNAC.
Dependencia a Ca <sup>++</sup>	positiva
Actividad aglutinante	Eritrocitos de rata y conejo
Actividad mitogénica	Negativo
	(rata, conejo, murino, humano)
Especificidad	9-O-acetil-siálico-R
	NeuAc $\alpha$ 2,3; GalNAc $\alpha$ 1; OSer/Thr

Gly (glicina), Ser (serina), Glx (glutámico); Asx (aspártico), Cys (cisteina).

Tabla 4. Especificidad hacia carbohidratos por la lectina sérica del langostino  
*M. rosenbergii*<sup>(38)</sup>.

Compuesto*	Concentración ( $\mu$ M)	Potencial inhibitorio
NeuGc	100	1
GlcNAc	50	2
GalNAc	50	2
NeuAc	50	2
Ácido colomínico ( $\alpha$ 2,8)	10 <sup>+</sup>	--
N-acetil-lactosamina( $\alpha$ 2,3)	25	4
N-acetil-lactosamina( $\alpha$ 2,6)	25	4
IgA suero humano	0.6	166
Glicopéptido de estroma de rata	0.03	3333
Asialoglicopéptidos de estroma de rata	NI	--
Fetuina O-glicopéptidos	0.9	111
Fetuina N-glicopéptidos	5.0	20
Mucina submaxilar ovina	0.1	1,000
Mucina submaxilar bovina	0.005	20,000
Asialomucina submaxilar bovina	NI	--
Mucina submaxilar bovina desacetilada	0.1	1,000

\* Concentración mínima requerida para inhibir 4 unidades hemaglutinantes de lectina purificada en presencia de eritrocitos tratados con pronasa.

+ Peso molecular no conocido; el valor corresponde a mg/mL.

NeuGc (ácido glucurónico), GlcNAc (N-acetil-glucosamina), GalNAc (N-acetil-galactosamina), NeuAc (ácido neuramínico).

Tabla 5. Actividad aglutinante de la lectina sérica de *M. rosenbergii*<sup>(38)</sup>.

Eritrocitos	Título de actividad*	residuo O-acetil siálico
Humanos A,B y O	0	negativo
Conejo	32	positivo
Rata	32	positivo
Gato	0	negativo
Carnero	0	negativo
Cerdo	0	negativo

\* Título de actividad aglutinante expresado como el inverso de la última dilución con actividad hemaglutinante.

## MATERIAL Y MÉTODOS

La existencia de una amplia diversidad de especies de invertebrados, con características fisiológicas diferentes, ha dado lugar a la estandarización de técnicas particulares para cada una de las especies. Las técnicas utilizadas para realizar el estudio morfológico de los hemocitos del langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan) y, su manejo en condiciones *in vitro* son descritas a continuación:

### REACTIVOS

Estos fueron utilizados con grado analítico de marca: SIGMA, Chemical Co. ST. Louis MO. USA; E. Merck, Darmstadt, RF. Alemania.

### OBTENCIÓN DE ESPECÍMENES

Organismos de langostino *Macrobrachium rosenbergii* (D.) en estadio C de acuerdo a Peebles<sup>(68)</sup>, fueron donados por la zona de explotación acuícola El Huamuchil, Jojutla: Morelos. Se mantuvieron en el laboratorio en recipientes de plástico de 45 X 60cm, con aereación permanente, a una temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y alimentados al libre albedrío.

## PURIFICACION DE LA LECTINA SÉRICA

La purificación de la lectina se llevó a cabo por cromatografía de afinidad, utilizando como matriz fetuina acoplada a Sepharosa 4-B (aproximadamente 30 mg de fetuina). Previamente equilibrada la columna cromatográfica con solución amortiguadora de acetato de sodio 2.5 mM; NaCl 0.1 mM; pH 6 y establecido el flujo de velocidad a 7 mL/h, se aplicó a la columna 1 mL (100 µg de proteína) de suero dializado del langostino *M. rosenbergii* (DeMan). El material no retenido (NR) se eluyó con amortiguador de acetato de sodio y la elución de la lectina se llevó a cabo adicionando 2 mL de glicina/HCl 0.1 M; pH 2.8. La presencia de la lectina se determinó a una densidad óptica de 280 nm.

## ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS HEMOCITOS DEL LANGOSTINO

El estudio morfológico de las células circulantes se realizó con hemocitos suspendidos que se obtuvieron fijados inmediatamente al ser extraídos del seno pericárdico y con células adheridas a portaobjetos.

### **Obtención y preparación de células suspendidas y adheridas para su observación por microscopía**

Las células suspendidas fueron obtenidas al extraer hemolinfa de la zona pericárdica del animal, utilizando una jeringa de 5 mL de 21 G X 32 mm, con aguja ultrafina (Plastipak), conteniendo: 1). Anticoagulante para crustáceos<sup>(69)</sup> (EDTA 20mM; citrato de sodio 30 mM; ácido cítrico 26 mM; glucosa 0.1M y cloruro de sodio 0.45 M; pH 4.6-5.8), previamente esterilizada a 10 libras durante 10 min y 2). Solución fijadora de glutaraldehído al 1.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M; pH 7.8. La proporción utilizada de ambas soluciones fue de 1:1 v/v

(anticoagulante-solución fijadora), y esta mezcla a la vez se utilizó en proporción de 6:1 v/v con respecto a la hemolinfa (lo que evitó que las células sufrieran alteraciones morfológicas o lisis). El tiempo de fijación de las células fue de 2 h a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C). Los lavados se realizaron con el amortiguador de cacodilato de sodio al 0.1 M en agua destilada; pH 7.8. Fijados los hemocitos se realizó un frotis de células suspendidas en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-lisina 5 mg/mL, en agua destilada. Esta solución se utilizó para cubrir los portaobjetos durante 1 min, a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C) para facilitar la adherencia de los hemocitos, de otra manera los hemocitos eran fácilmente desprendidos al ser lavados con soluciones.

La obtención de células adheridas a portaobjetos consistió en colocar alicuotas de 50  $\mu$ L de células previamente obtenidas del seno pericárdico en anticoagulante<sup>(59)</sup> (1:6 v/v con respecto a la hemolinfa) y, lavadas por centrifugación a 1 800 rpm, a 4 °C, durante 5 min, con solución de Van Harrevald (SVH)<sup>(60)</sup> (cloruro de sodio 20 mM, cloruro de calcio 1 mM, cloruro de magnesio 0.05 mM; cloruro de potasio 0.05 mM, bicarbonato de sodio 0.02 mM; pH 7.4-7.5). El tiempo de adherencia de las células fue de 30 min a temperatura ambiente. Las células no adheridas se eliminaron por lavados con SVH, posteriormente la fijación de las células adheridas se realizó con glutaraldehído al 1.5% en solución de cacodilato de sodio 0.1 M; pH 7.4, y el exceso de este fijador se eliminó con amortiguador de cacodilatos de sodio 0.1 M; pH 7.4. Finalmente el portaobjetos con células adheridas se dejó secar al aire para ser teñidas las células con Hematoxilina-Eosina (H&E) o para procesar para microscopía electrónica de barrido.

La tinción de H&E se realizó al incubar las preparaciones de hemocitos adheridos al portaobjetos, en el colorante de hematoxilina durante 1 min a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C), el exceso del colorante fue eliminado con agua del grifo y, posteriormente el portaobjetos se transfirió a la solución de alcohol-ácido (etanol 70% / HCl 5%), por unos segundos. El exceso de alcohol-ácido, se eliminó por lavados en agua del grifo para ser transferida la laminilla al agua



amoniacal 5%, la tinción fue contrastada en eosina al 1% en agua destilada durante 4 seg a temperatura ambiente, y así, continuando con la deshidratación por soluciones de alcohol al 96%, alcohol absoluto, alcohol-xilol (1:1 v/v) para ser transferida finalmente a xilol, y llevar a cabo el montaje con resina-xilol, para su observación con fotomicroscopio Zeiss.

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Para el estudio ultraestructural de los hemocitos circulantes se preparó un botón de células suspendidas, el cual se obtuvo centrifugando la hemolinfa (a 1 800 rpm, a 4°C durante 5 min), mezclada con solución anticoagulante-fijador. Posteriormente la fijación de los hemocitos se realizó con glutaraldehído al 1.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.8, durante 30 min. El botón de hemocitos fijados fue postfijado en tetróxido de osmio acuoso al 1%, durante 45 min a 4°C. El exceso de tetróxido de osmio se eliminó lavando tres veces el botón por centrifugación a 1 800 rpm, a 4°C durante 5 min (cada lavado), en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M. La deshidratación del botón se realizó en alcoholes hasta óxido de propileno. La inclusión del botón, se llevó a cabo en Araldita 6005 contrastando en acetato de uranilo y citrato de plomo de acuerdo con Reynolds<sup>(61)</sup>. Finalmente, los cortes ultrafinos se obtuvieron con cuchilla de diamante para ser observados en un microscopio electrónico EM-109 Zeiss.

### **Microscopía electrónica de barrido**

Hemocitos adherentes (técnica descrita previamente) fueron fijados y procesados para microscopía electrónica. Esto consistió en realizar tres lavados a la muestra con el amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M a pH 7.4, y postfijados con tetróxido de osmio 1%, a 4°C durante 15 min. Posteriormente, la

muestra fue deshidratada pasando por alcoholes en concentraciones crecientes y desecado por punto crítico. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido (DSM) a 25 kV.

## **MONOCAPA DE HEMOCITOS ADHERENTES PARA ENSAYOS DE FAGOCITOSIS**

La obtención de los hemocitos para su adherencia a portaobjetos se logró sangrando al langostino del seno pericárdico con una jeringa que contenía previamente anticoagulante para crustáceos (1:6 v/v) (técnica previamente descrita). Lavadas las células por centrifugación para la eliminación del anticoagulante el botón fue resuspendido en 1 mL de SVH para determinar la viabilidad de las células, el método consistió en agregar el colorante de azul tripán al 0.002% en amortiguador de fosfatos (PBS), pH 7.2-7.4 (previamente esterilizado por filtración con membrana de 0.22  $\mu$ m), en proporción 10  $\mu$ L de colorante/10  $\mu$ L de la alícuota del botón de células resuspendidas, indicándose la muerte celular mediante la tinción azul. El ensayo de fagocitosis consistió en dejar incubar la monocapa de hemocitos adheridos en presencia de eritrocitos de pollo y de humano tipo O, a temperatura ambiente 25°C durante 45 min. Los eritrocitos no fagocitados fueron eliminados por lavados con SVH, finalmente las células fueron fijadas con glutaraldeído al 1.5% en solución de cacodilato de sodio 0.1M; pH 7.4.

### **Tratamiento enzimático para eritrocitos**

Con la finalidad de modificar la estructura de la membrana de los eritrocitos de vertebrados y determinar su efecto sobre la actividad fagocítica por los hemocitos del langostino, los eritrocitos se incubaron con enzima de pronasa (de

*Streptomyces griseus*)<sup>(62)</sup> o neuraminidasa (de *Clostridium perfringens*)<sup>(63)</sup>. El tratamiento de los eritrocitos, consistió en adicionar 1 mg de enzima diluída en 100 µl de la solución salina isotónica a cada paquete de eritrocitos (0.5 mL) de las diversas especies de vertebrados, previamente lavados por centrifugación a 3 000 rpm a 4°C durante 5 min en solución salina isotónica, incubando durante 45 min a 37°C. Posteriormente los eritrocitos fueron lavados con solución isotónica por centrifugación a 3 000 rpm a 4°C durante 5 min. Finalmente se ajustó la concentración a 10:1 eritrocito/hemocito.

#### **Efecto de carbohidratos sobre la actividad fagocítica de hemocitos**

Con la finalidad de determinar el efecto de los carbohidratos sobre la actividad fagocítica se procedió a incubar la monocapa de hemocitos adheridos, con carbohidratos (GlcNAc, GalNAc, NeuAc) en concentración de 100 mM en amortiguador salina tris-fosfato TBS (Tris 0.01 M; fosfato de sodio 0.05 M; cloruro de sodio 0.154 M; cloruro de calcio 5 mM; pH 7.4), o glicoproteínas (NeuAc α2,3 lactosa 20 mM; NeuAc β2,6 lactosa 20 mM; mucina de la glándula submaxilar bovina 0.02 mM; fetuína 0.02 mM), durante 10 min a 25°C, previo a la adición de eritrocitos de pollo. Este ensayo se evaluó a los 30 min después de la incubación en presencia de los eritrocitos.

#### **Efecto de la lectina sobre la actividad fagocítica de hemocitos**

Para determinar la participación de la lectina sérica del langostino y su participación como opsonizador de células que serían fagocitadas por los hemocitos en monocapa, se utilizaron eritrocitos tratados con lectina: alícuotas de 500 µL de paquete de eritrocitos fueron incubados con diferentes concentraciones de la lectina sérica (0.001 µg/mL como concentración subaglutinante, hasta

10.0 µg/mL) durante 30 min a 25°C. Posteriormente, el exceso de la lectina se eliminó lavando al paquete de eritrocitos con solución salina isotónica y centrifugando a 3 000 rpm, a 4°C durante 5 min. Los ensayos de fagocitosis se realizaron en las condiciones antes mencionadas y el efecto de la lectina fue evaluado al comparar los índices fagocíticos de las monocapas de hemocitos incubados con eritrocitos no tratados.

### **Efecto de la temperatura sobre la actividad fagocítica**

El ensayo se llevó a cabo al incubar monocapas de hemocitos con eritrocitos de pollo (en proporción 10:1 eritrocito/hemocito) a diferentes temperaturas 4 °C, 10°C, 20°C, 30°C y 40°C, durante 30 min. Los eritrocitos no fagocitados fueron eliminados por lavados en decantación utilizando SVH, para ser posteriormente teñida la monocapa de hemocitos con H&E. Se consideró actividad fagocítica positiva al identificar por lo menos un eritrocito adherido al hemocito, esta evaluación se realizó por microscopía CID (Nomarski).

### **MARCAJE DE CARBOHIDRATOS DE SUPERFICIE**

#### **Lectinas biotiniladas.**

Para determinar cualitativamente los carbohidratos de superficie de los hemocitos se utilizaron lectinas comerciales con especificidad conocida acopladas a biotina (SIGMA Fine, Chem. St. Louis Mo USA). El marcaje de carbohidratos se realizó en células adheridas, las cuales fueron tratadas previamente con Tritón X100 al 0.001% en PBS 1 M (fosfato de sodio dibásico 2 mM; cloruro de potasio 2 mM; fosfato de potasio monobásico 1 mM; pH 7.4. Posteriormente, las células fueron incubadas con peróxido de hidrógeno (1:9 v/v en agua) durante 10 min a temperatura ambiente con la finalidad de bloquear la

peroxidasa endógena. El exceso de peróxido fue eliminado por lavados en PBS, y luego adicionar la lectina biotinilada (12.5  $\mu$ m de lectina en 250  $\mu$ m de PBS; pH 7.4), incubando durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con PBS (de 5 min cada uno) y se dejó escurrir la laminilla. Se adicionó el complejo estrepto-avidina-peroxidasa dejando incubar durante 1 h a temperatura ambiente; se realizaron nuevamente tres lavados en PBS y se colocó la solución reveladora (la cual se describe a continuación), dejando incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó un lavado en agua destilada para montar la preparación en gelatina-glicerinada.

La solución reveladora consistió de:

Solución A: Trizma 2.423 g/100 mL de agua destilada.

Solución B: ácido clorhídrico 0.833 mL/100 mL de agua destilada.

Solución C: formada por 5 mL de solución A, 8 mL de solución B y 7 mL de agua destilada.

La Solución 1, esta compuesta de 10 mL de solución C, más 5 mg de diaminobenzidina (DAB).

La Solución 2, comprende 10 mL de solución C, más 0.3 mL de peróxido.

De esta última solución se toma 0.1 mL y se adiciona a la solución 1, la cual finalmente será la solución reveladora.

### **Obtención y purificación de inmunoglobulinas G contra la lectina**

Los anticuerpos se obtuvieron de un conejo Nueva Zelanda de dos meses de edad, el cual fue inoculado previamente por vía intraperitoneal con 100  $\mu$ g de lectina en 0.5 mL de adyuvante completo de Freund, esa mezcla le fue aplicada cada 10 días y al tercer mes se obtuvo sangre de la vena marginal de la oreja. Posteriormente el suero fue precipitado con sulfato de amonio al 50% de saturación a 4°C. El material precipitado, que contenía las inmunoglobulinas G

(IgG), fue dializado contra PBS 0.15 M a pH 7.4, y posteriormente se obtuvieron los anticuerpos purificandolos por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephadex) mediante un gradiente de elución de NaCl de 0.1 a 0.5 M. La especificidad fue identificada por inmunoelectroforésis.

### **Identificación de la lectina sobre la membrana de hemocitos circulantes**

Para identificar la presencia de la lectina del langostino *M. rosenbergii* (DeMan) en los hemocitos circulantes de la propia especie, se realizó el siguiente marcaje: hemocitos adheridos fijados (tratados previamente con peróxido de hidrógeno al 0.3%, y bloqueadas las proteínas con albúmina sérica bovina BSA 1% en PBS/Tween 20, al 0.05% durante 45 min a temperatura ambiente) fueron incubados con inmunoglobulina G hiperinmune (obtenida en conejo) marcada con biotina en relación 1:100 en BSA/PBS/Tween 20, durante 1 h. El exceso de anticuerpos se eliminó por lavados en PBS para adicionar el complejo estrepto-avidina-peroxidasa (1mg/mL), dejando incubar durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron lavados en amortiguador PBS, y finalmente se adicionó la solución reveladora eliminando el exceso de la solución con agua destilada para finalmente montar la preparación con gelatina glicerizada para su observación por microscopía CID (Nomarski).

### **OBTENCIÓN DE PATÓGENOS DEL LANGOSTINO**

De organismos del langostino *M. rosenbergii* (DeMan) que presentaron lesiones visibles de la cutícula de los urópodos y parte dorsal del caparazón, fueron tomadas muestras bacteriológicas para ser aisladas en agar de soya tríptica (BBL Cokeysville, USA). Las bacterias se crecieron en medio de agar-sangre, incubando a 30°C. La identificación de las especies bacterianas fue

realizada por la M.C. Laura Jaramillo del Instituto Nacional de Investigación Forestales y Agropecuaria (INIFAP), de acuerdo a la metodología reportada en Koneman y cols.<sup>(64)</sup>.

## RECONOCIMIENTO DE LO NO PROPIO POR LA LECTINA SÉRICA

### Pruebas de aglutinación de bacterias.

Para determinar el reconocimiento de lo no propio por la lectina sérica del langostino, se realizaron ensayos de actividad aglutinante, en este caso utilizando células bacterianas aisladas de la cutícula del langostino *M. rosenbergii* (DeMan), consideradas por Bautista<sup>(28)</sup> como especies patógenas oportunistas. La determinación del reconocimiento por la lectina hacia células bacterianas se demostró por medio del ensayo de actividad aglutinante en una placa rígida de fondo plano (NUNC, Denmark). Este ensayo consistió en diluir de manera seriada 25 µl de hemolinfa sérica con una actividad aglutinante de 1:32 unidades hemaglutinantes (UHA), para adicionar posteriormente a cada pozo 25 µl del stock de células bacterianas en suspensión, previamente tratadas en fijador de formaldehído al 0.4% durante 1 h a 4°C, y eliminando el exceso de fijador por lavandos en centrifugación a 3 000 rpm, durante 10 min a 4°C. La concentración de células bacterianas en solución PBS, fue establecida al 0.15 de densidad óptica a 540 nm. La mezcla lectina-bacterias se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. La aglutinación positiva se determinó con microscopio invertido (IMT-2, Olympus).

Los ensayos se realizaron por triplicado, y al testigo no se le adicionó lectina. El resultado se expresa considerando el título de la actividad aglutinante de la última dilución. Las especies bacterianas utilizadas en el ensayo fueron *Bacillus cereus*, y *Aeromonas* sp., patógenas oportunistas del langostino. Otras especies a prueba fueron *Pasteurella haemolytica* (Biotipo A, serotipo capsular

5,6,11 y 12; Biotipo T, serotipo capsular 3,4); *Pasteurella multocida* (serotipo capsular 9, 10 y 13); *Salmonella aureus*; *Salmonella. arizona*; *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) y *Escherichia coli*.



## RESULTADOS

Como ya se mencionó, el presente estudio tiene como finalidad obtener conocimientos básicos sobre los mecanismos de inmunidad que posee el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan), para lo cual se consideró llevar a cabo: 1. la caracterización morfológica de los hemocitos circulantes; 2. la identificación del tipo de hemocito que presenta la actividad fagocítica; 3. la identificación de los patógenos bacterianos que afectan a esta especie así como su reconocimiento por la lectina sérica. Parte importante de este trabajo es la identificación de los mecanismos específicos, dirigidos hacia carbohidratos, que se encuentran circulando en el suero y otros asociados a la membrana de un grupo de hemocitos, los cuales participan en el reconocimiento de lo no propio. Con esto, pretendemos contribuir al estudio sobre el sistema inmunológico de los crustáceos, dada la situación epidemiológica que afecta a esta y otras especies de explotación comercial.

### CLASIFICACIÓN DE LOS HEMOCITOS

Dada la heterogeneidad estructural que presentaron los hemocitos circulantes del langostino *M. rosenbergii* (DeMan), el estudio morfológico para la clasificación de los hemocitos circulantes se llevó a cabo en las células suspendidas y adheridas. Las observaciones realizadas por microscopía de contraste-inteferencial-diferencial CID (Nomarski), se confirmaron por microscopía electrónica de transmisión MET y microscopía electrónica de barrido MEB. La identificación de los tipos de hemocitos se basó principalmente en la forma y tamaño del hemocito; la relación núcleo-citoplasma; la presencia de ciertas estructuras como son las vesículas y gránulos citoplásmicos. En el transcurso de la descripción de los tipos de hemocitos se hará referencia a las figuras citadas

en el artículo "Morphological analysis of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*" (pág.69).

De acuerdo con nuestras observaciones, clasificamos a los hemocitos en tres tipos (Fig.1, pág. 86).

1. Hemocitos fusiformes. Estos hemocitos son el tipo de células más abundantes, comprende cerca del 68% del total de los hemocitos suspendidos (Fig. 1(F), pág. 86). Con microscopía CID (Nomarski) se observan células con forma alargada fusiforme de tamaño variable ( $31.2 \pm 12 \mu\text{m} \times 4.8 \pm 2 \mu\text{m}$ ), Tabla 1 (pág. 84). Su núcleo es elongado y puede ser cental o excentral. Su citoplasma puede contener algunos gránulos o carecer de estos. La superficie celular generalmente es lisa o con algunos filópodos los cuales, varían en longitud al adherirse a la superficie de vidrio. Por MET, las células fueron claramente identificadas; poseen el núcleo elongado con abundante heterocromatina; también es evidente una cisterna perinuclear. El citoplasma se caracteriza por la presencia de gránulos esféricos, electro-densos rodeados por una membrana. Sin embargo, la característica principal de este tipo de hemocito es la presencia de grandes vesículas citoplasmicas de forma irregular, con un contenido electro-denso débil granular (Fig. 3(a,b), pág. 87). En las bservaciones por MEB, estas células en suspensión muestran superficie rugosa; en las células adherentes la superficie es lisa con algunos filópodos y procesos similares a lamelipodos, los cuales varían en longitud al unirse a la superficie del vidrio (Fig. 8(a-b), pág. 90). En cuanto a su actividad biológica, se observó que pueden sufrir autolisis, ya que el número de estas células disminuye al realizar los ensayos de adherencia.

2. Hemocitos grandes ovoides. Incluye el 23% de las células suspendidas examinadas por microscopía CID (Fig. 1(L)). Por MET se consideró que este es el grupo más heterogéneo de las células en cuanto al número y tamaño de los gránulos citoplásmicos (Fig. 5(a-c) y Fig. 6(a-b), pág. 88), lo cual podría sugerir diferentes propiedades funcionales. De este grupo de hemocitos podrían distinguirse dos subtipos: subtipo I). las células que presentan un núcleo excentral, irregular u ovoide. El citoplasma presenta gránulos esféricos electro-

densos y sólo algunos son redondos con electro-lucidez, por otra parte también se observan vesículas; ambas estructuras (gránulos y vesículas), pueden incrementar su tamaño llegando a formar agregados característicos (Fig. 5(a-c)). El subtipo II), incluye a las células de mayor tamaño, pero su número es escaso. Se caracterizan por presentar abundantes gránulos esféricos electro-densos en el citoplasma, algunos gránulos son de forma redonda y pocas vesículas pequeñas con electro-lucidez; los gránulos y vesículas en este subtipo de hemocito están distribuidos de manera homogénea en las células que presentan un núcleo elongado y anfractuoso (Fig. 6a), mientras que en las células que presentan un núcleo excentral, las inclusiones son localizadas en un extremo (Fig. 6b). El pleomorfismo en este grupo realmente es pobremente evidenciado cuando son observadas las células suspendidas por MEB (Fig. 2b(L), pág. 86). De cualquier manera su observación por microscopía de contraste de fases después de su adherencia en vidrio (Fig. 7(a-d), pág 89), nos revela que estos granulocitos presentan grandes cambios los cuales son caracterizados por un cuerpo celular extendido y plano, con la formación de pseudopodos y filópodos que irradian fuera del citoplasma; su núcleo frecuentemente se observó rodeado por vesículas y numerosos gránulos, llegando a encontrarse también en pseudópodos.

3. Hemocitos pequeños redondos. Las observaciones por microscopía CID indican que este grupo comprende cerca del 8% del total de los hemocitos (Fig. 1(S)). Estas células son pequeñas de forma redonda u ovoide, su citoplasma puede contener escasos gránulos. Observaciones por MET muestran que el núcleo es central, presenta una evidente cisterna perinuclear; el citoplasma ocasionalmente muestra estructuras similares a los gránulos. La MEB muestra la presencia de numerosos pseudópodos y filópodos localizados de manera polarizada en las células adherentes (Fig. 8C, pág. 90), los cuales no son visibles en hemocitos suspendidos (Fig. 2a (s)).

Una vez clasificados los hemocitos de acuerdo con sus características morfológicas logramos realizar una correlación con la actividad biológica. Las principales actividades biológicas identificadas son: la autólisis, manifestada

principalmente por los hemocitos fusiformes que generalmente carecían de gránulos citoplasmicos (observaciones realizadas durante el manejo de células) y la actividad fagocítica (Fig. 10(d-f), pág. 92), función realizada por los hemocitos grandes ovoides, esta última actividad se describe a continuación.

## ACTIVIDAD FAGOCÍTICA

En cuanto al tipo de hemocito que muestra la actividad fagocítica, se identificó particularmente al tipo de granulocitos grandes ovoides, este grupo conforma el 23% del total de los hemocitos.

Las tablas y figuras citadas en los resultados correspondientes a este tema se presentan en el artículo "Participation of the lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes in the recognition of non-self cells".

Los estudios sobre la actividad fagocítica de los hemocitos del langostino, se realizaron en hemocitos adheridos en monocapa a portaobjetos en presencia de eritrocitos de pollo (de tres días de edad), rata, conejo, ratón, caballo, cerdo, y eritrocitos humanos tipo A, B y O. Nuestros resultados muestran que existe una preferencia fagocítica por los eritrocitos de pollo, rata y conejo (Tabla 1, pág. 110), los cuales característicamente presentan en su superficie 20% a 30% de 9-O-acetil siálico. En relación con los mismos eritrocitos pero tratados con las enzimas neuraminidasa y pronasa (con la finalidad de identificar los receptores de superficie de los eritrocitos que podrían influir en el reconocimiento por los fagocitos), se mostró una disminución en dicha actividad fagocítica incluso hacia los mismos eritrocitos al ser tratados previamente con la enzima neuraminidasa, pero no así para los eritrocitos tratados con pronasa (Tabla 1, pág. 110). Por lo cual suponemos que la eliminación de los residuos del ácido siálico por el tratamiento enzimático, provoca la disminución de la capacidad de reconocimiento de la lectina hacia los hemocitos tratados. Sin embargo, los ensayos sobre la participación opsonica de la lectina, para lo cual se utilizaron eritrocitos

previamente tratados con la lectina sérica del langostino en concentraciones de 0.001 µg a 10.0 µg de proteína; este ensayo nos reveló que la actividad fagocítica de los eritrocitos opsonizados no se incrementa, incluso en los eritrocitos que son realmente reconocidos por la lectina sérica como podrían ser los eritrocitos de rata y conejo.

### ESPECIFICIDAD DE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA POR CARBOHIDRATOS

El efecto de los carbohidratos sobre la actividad fagocítica de los hemocitos del langostino, fue evaluada utilizando hemocitos tratados previamente con carbohidratos simples y oligosacáridos a concentración de 100mM y 20 mM respectivamente. Los resultados obtenidos indican que existe aparentemente un proceso de reconocimiento específico debido a que la actividad fagocítica decrece en presencia de carbohidratos y oligosacáridos que contienen grupos N-acetilados o glicoproteínas sialiladas. Con respecto a otros azúcares como: D-glucosa, D-manosa, D-galactosa o fucosa a concentración de 100 mM no provocan alteración en la actividad fagocítica (Tabla 2, pág. 111).

Con la intención de aportar indicios que permitan apoyar la posible influencia de los factores físicos en la actividad fagocítica, se realizaron ensayos de fagocitosis con eritrocitos de pollo a diferentes temperaturas, encontrándose que la temperatura favorable para la realización de dicha actividad *in vitro*, oscila entre 24-30 °C (Fig. 2, pág. 113). Sin embargo, en presencia de otro tipo de eritrocitos como los humanos, la temperatura no parece ser un factor condicionante para la fagocitosis, lo que sugiere que se trata de mecanismos diferentes.

## CARACTERIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE CARBOHIDRATOS DE LA SUPERFICIE DE LOS HEMOCITOS

Con la finalidad de identificar algunos marcadores fenotípicos que nos permitieran proponer alternativas para la identificación de poblaciones celulares del langostino, se caracterizó a los carbohidratos de superficie de los hemocitos circulantes, mediante la aplicación de ensayos citoquímicos con lectinas comerciales que presentan diferente especificidad. Con este procedimiento se logró detectar un marcaje positivo en los hemocitos granulares (Subtipo I y II) para los siguientes carbohidratos:  $\alpha$ -D-Manosa (lectina de *Lens culinaris*, LCA) para el 100% de las células; GalNAc (la lectina de *Amaranthus leucocarpus*), el 90%;  $\alpha$ -D-Manosa y  $\alpha$ -D-Glucosa (para la lectina Con A), un 50%, ácido siálico (la lectina de *Limulus polyphemus*), el 50%. Las lectinas con especificidad hacia  $\beta$ -D-Gal (de *Arachis hypogaea*) y ácido siálico  $\alpha$ 2,6 D-GalNAc (de *Sambucus nigra*) dieron una reacción negativa. Todo esto nos revela que la membrana citoplasmática de los hemocitos granulares presenta en su glicocalix estructuras de carbohidratos particularmente formadas por:  $\alpha$ -D-Manosa,  $\alpha$ -D-Glucosamina y grupos N-acetil-lactosamínicos sialilados (con un residuo de ácido siálico en el enlace  $\alpha$  2,3, debido a que posee una interacción negativa con la lectina de *Sambucus nigra*). Hacemos énfasis de que la lectina sérica del langostino no fue capaz de reconocer a los hemocitos circulantes, lo cual indica además que los hemocitos carecen de residuos del derivado O-acetil-siálico.

Por otra parte, mediante la aplicación de los anticuerpos de conejo dirigidos contra la lectina sérica del langostino, logramos identificar una reacción positiva en ensayos inmunohistoquímicos en los grupos celulares granulares con capacidad de fagocitar y, también se identificó que la actividad fagocítica era inhibida por tales anticuerpos,. Esto permitió suponer que las células granulares pueden ser el sitio de síntesis de la lectina sérica y, además que la especificidad de reconocimiento de las células no propias por los hemocitos puede estar dada por la participación de una lectina presente en la membrana de los hemocitos, la

cual posee aparentemente un número importante de epítopes comunes con la lectina sérica.

## RECONOCIMIENTO DE LO NO PROPIO POR LA LECTINA

Las lectinas precipitan glicoconjugados solubles y se unen a estructuras que poseen carbohidratos como determinantes. Cuando tales determinantes se encuentran en las glicoproteínas o glicolípidos de membrana, inducen el proceso de aglutinación, el cual se puede presentar con diversos tipos celulares.

En nuestros resultados sobre la detección e identificación de los microorganismos causantes de daños visibles a organismos del langostino, en la zona de explotación acuícola "El Huamuchil", Jojutla: Morelos, fueron identificadas las bacterias: *Aeromonas* sp. y *Bacillus cereus*. Las cuales son consideradas bacterias quitinolíticas, oportunistas para decápodos, que llegan a provocar en los animales úlceras cuticulares. Las úlceras provocadas por estas bacterias se caracterizan por presentar un área de melanización cuticular focal o multifocal que puede dar lugar a un daño muscular e incluso a una septicemia fatal.

Las tablas citadas en estos resultados corresponden al artículo "Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*".

Como se ha mencionado anteriormente la especificidad de la lectina está dirigida hacia estructuras de los derivados O-acetilados del ácido siálico, lo que le permite aglutinar únicamente a los eritrocitos de rata y conejo. Nuestros resultados de los ensayos de actividad aglutinante e inhibición de la misma con carbohidratos, para determinar la interacción específica en el reconocimiento lectina-bacteria, demuestran que existe un reconocimiento hacia *Aeromonas* sp., y a *Bacillus cereus*. Como resultado de una actividad aglutinante positiva hacia otras células bacterianas utilizadas en los ensayos de aglutinación fueron: *Pasteurella haemolitica*, pero únicamente la que posee el Biotipo A serotipo

capsular 12; de las cepas de *P. multocida* fue aglutinado sólo el serotipo capsular 9; las cepas *Salmonella aureus*, *S. arizona*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, fueron aglutinadas con un título de actividad menor (Tabla 1, pag. 119 y Tabla 2, pag. 120).

En este trabajo se ha demostrado que la lectina sérica de *M. rosenbergii* (DeMan) aglutina específicamente ciertas cepas bacterianas como las de *Pasteurella haemolytica*. En este aspecto, se ha demostrado que la lectina de germen de trigo específica por N-acetil-D-glucosamina y ácido siálico, permite la identificación de cepas de *P. haemolytica* pero sólo las que poseen el biotipo T, con los serotipos capsulares 3, 4 y 10, debido posiblemente a la interacción con determinantes acetilados en los oligómeros de la pared bacteriana. Por otra parte, el serotipo capsular 12 de *P. haemolytica*, contiene gran cantidad de derivados O-acetilados y O-metilados, razón por la cual se considera que este determinante permite la interacción con la lectina sérica de *M. rosenbergii* (DeMan). Un proceso de reconocimiento similar se observa con las cepas de bacterias *Aeromonas spp* y *Bacillus cereus*, las cuales poseen pentosas con derivados O-acetilados. El ácido teicoico de algunas cepas bacterianas Gram positivas como *Staphylococcus*, poseen N-acetil-D-glucosamina en posición terminal lo que determina el reconocimiento por la lectina del langostino. En tal caso, este proceso de reconocimiento podría ser determinante para la eliminación de microorganismos mediante ciertos eventos biológicos como son la encapsulación, formación de nódulos o la fagocitosis.



## DISCUSIÓN

Nuestras primeras consideraciones para la clasificación de los hemocitos circulantes del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan), fueron realizadas por microscopía de luz, y se basaron en la presencia y ausencia de gránulos criterio establecido por Hose y cols.<sup>(11)</sup> y Lanz y cols.<sup>(12)</sup>. Sin embargo, por este tipo de microscopía fue difícil identificar tales características definidas entre los hemocitos debido a que existe un pleomorfismo en los hemocitos del langostino *M. rosenbergii* (DeMan), en cuanto a la forma, el tamaño y número de gránulos, así como el determinar la clara ausencia de los gránulos. Observaciones realizadas para otras especies como el acocil *Procambarus clarckii* (Girard)<sup>(12)</sup>. Dada esta problemática para la identificación de los hemocitos, se procedió a establecer la clasificación a partir de los hemocitos suspendidos (fijados inmediatamente al ser extraídos de la hemolinfa) llevando a cabo el análisis morfológico por microscopía electrónica de transmisión MET para posteriormente ser correlacionados con los hemocitos adherentes observados por microscopía electrónica de barrido MEB. De acuerdo a las técnicas anteriormente descritas fue posible obtener una buena conservación morfológica y un alto número de células. De esta manera al integrar las imágenes logramos establecer los tres tipos de hemocitos:

1). hemocitos fusiformes, los cuales son los más abundantes (68%) y fácilmente distinguibles por microscopía de luz. Este tipo de hemocitos comparte las características de una típica célula hialina de la langosta roja *Panulirus interruptus* (Randall)<sup>(11)</sup> en la cual comprenden el 56% del total de los hemocitos, por presentar una forma ovoide con escasos gránulos grandes citoplasmicos sin embargo, para otras especies como en la langosta americana *Homarus americanus* H. Milne<sup>(11)</sup> los hemocitos contienen numerosos gránulos pequeños y su porcentaje es inferior al observado en otras especies de crustáceos (21%). Tsing y cols.<sup>(36)</sup> proponen para el camarón tigre *Penaeus japonicus* Bate, la

terminología "hemocitos indiferenciados" para las células cuyas características no son bien diferenciadas e incluso presentan escasos granulos citoplásmicos, este tipo de célula se encuentran en baja proporción y presentan una actividad autolítica natural.

En el grupo de los hemocitos de gránulos pequeños, también denominados "semigranulares", se han considerado aquellas células que contienen una amplia relación citoplasmica con abundantes gránulos de diversos tamaños. En el langostino *M. rosenbergii* (DeMan), este grupo de células fue identificado como hemocitos grandes ovoides, los cuales presentan un alto pleomorfismo. De acuerdo con nuestro estudio por microscopía electrónica de transmisión proponemos que este grupo está constituido por dos subtipos celulares los cuales pueden ser diferenciados de acuerdo al número y a la distribución de los gránulos los cuales son electro-densos o electro-lucidez.

Por la variabilidad que existe tanto en el tamaño como en el número de gránulos en los hemocitos granulares de los crustáceos, Bodammer<sup>(36)</sup> y Mix y Sparks<sup>(65)</sup>, han propuesto la hipótesis de la existencia de una sola línea celular, la cual va de células agranulares a células con gránulos grandes (o viceversa) y por lo tanto, sus características morfológicas dependen del estado de maduración celular. Nosotros proponemos que de existir un proceso sucesivo de maduración en el tipo de hemocitos ovoides grandes, podrían estar representados por el subtipo I y el subtipo II reportados en nuestro trabajo; el subtipo I contiene tres estadios de diferenciación, identificados por la condensación de la heterocromatina así como por el incremento y distribución en el número de gránulos y vesículas citoplásmicas; para el subtipo II, que incluiría probablemente dos estadios de maduración sugeridos de igual manera por la condensación gradual de la heterocromatina así como por el incremento y distribución de los gránulos citoplásmicos y vesículas. En cuanto a su actividad biológica se confirmó por ensayos de fagocitosis en monocapa que este tipo de hemocitos llevan a cabo ésta actividad. Característicamente estas células poseen pseudópodos para tomar partículas extrañas; estructuras similares se han observado en fagocitos de

moluscos<sup>(6)</sup>. Citoquímicamente se ha demostrado por Hose y cols.<sup>(11)</sup> que estas células poseen lisosomas, las cuales contienen una variedad de enzimas degradantes que son importantes para la eliminación del material fagocitado.

En cuanto al tercer tipo llamado hemocitos con gránulos grandes o "refráciles", también han sido identificadas en especies de camarones como la langosta roja *P. interruptus* (Randall)<sup>(11)</sup> que comprenden el 9.8% del total de los hemocitos y para la langosta americana *H. americanus* H. Milne<sup>(11)</sup> el 16% y para el camarón tigre *P. japonicus* Bate<sup>(36)</sup> el 12%, estas células se han caracterizado por presentar generalmente grandes gránulos refráciles, lo cuales no fueron observadas en el langostino *M. rosenbergii* (DeMan). Sin embargo, en *M. rosenbergii* (DeMan), identificamos un tercer tipo celular al cual, denominamos hemocitos pequeños redondos y, por su tamaño y escasa presencia de organelos definidos hemos considerado como células indiferenciadas, las cuales sean probablemente los antecesores de las células grandes ovoides, ya que manifiestan la capacidad de adherencia y desarrollo de pseudópodos y filópodos.

La fagocitosis es sin duda uno de los mecanismos de defensa más antiguo desde el punto de vista evolutivo; los primeros organismos heterótrofos debieron haber presentado algún mecanismo que les permitiera reconocer a las partículas que serían fagocitadas. En organismos pluricelulares, se ha identificado la participación activa de las lectinas en procesos de reconocimiento de grupos celulares considerados como patógenos, sin embargo, también participan en diversos eventos tales como: la agregación celular, la fertilización, el desarrollo embrionario, la reparación de daño, la metamorfosis y el transporte de azúcares complejos<sup>(2,27)</sup>.

La capacidad de las lectinas de interactuar con diversos grupos celulares ha sido la explicación para entender la regulación de la respuesta celular en los invertebrados. Debido a que estos organismos tienen un limitado repertorio celular. Las lectinas en estos organismos se localizan principalmente circulando en la hemolinfa, y en diversos estudios anteriormente citados, se ha demostrado que participan activamente en procesos de opsonización. Estudios realizados por

Renwranz y cols.<sup>(66)</sup>, identificaron que el caracol de jardín *Helix pomatia*, posee una lectina sérica específica para el grupo N-acetil-D-galactosamina en posición terminal y para los eritrocitos humanos del grupo A; por otra parte los ensayos *in vivo*, demostraron que al ser inoculados los eritrocitos humanos al hemocele del animal, fueron rápidamente fagocitados de igual manera que los eritrocitos del grupo A tratados con la lectina previo al ensayo; el experimento con eritrocitos humanos B tratados con lectina no modificó su rango de eliminación. Ensayos realizados por McKay y Jenkin<sup>(25)</sup>, en el cangrejo australiano *Parachaeraps bicarinatus*, utilizando eritrocitos de carnero opsonizados con esta lectina sérica, no fueron fagocitados rápidamente a diferencia de los eritrocitos no opsonizados.

Los hemocitos del langostino *M. rosenbergii* (DeMan) no incrementan significativamente la actividad fagocítica cuando se encuentran en presencia de eritrocitos tratados con la propia lectina o hemolinfa. Esto sugiere que la lectina aislada de la hemolinfa no participa en el reconocimiento o la eliminación de partículas extrañas, pero fue posible demostrar que los hemocitos poseen un mecanismo de reconocimiento específico mediado por los carbohidratos N- y O-acetilados semejante al patrón de especificidad mostrado por la lectina sérica, debido a la preferencia de eritrocitos que contiene derivados del ácido O-acetil-siálico, como los eritrocitos de conejo, rata y pollo.

Mediante ensayos inmunohistoquímicos, utilizando anticuerpos contra la lectina sérica fue posible demostrar la presencia de una lectina en la membrana de un grupo de hemocitos del langostino. Estos resultados indican que tanto la lectina sérica como la asociada a la membrana poseen especificidad semejante y además comparten epítopes. Esto nos sugiere que muy posiblemente los hemocitos son el lugar de síntesis de la lectina y por lo tanto la lectina sérica no ejerce ningún efecto en la actividad fagocítica de los hemocitos. De manera importante se observó que los hemocitos que participan en la actividad fagocítica corresponden principalmente a los hemocitos granulares ovoides; y es este grupo celular el que presenta un reconocimiento positivo los anticuerpos contra la lectina sérica.

La influencia de los factores físicos como lo es la temperatura en la actividad fagocítica de los hemocitos hacia los eritrocitos de pollo, se determinó que esta fue favorable entre 24 a 30 °C. En presencia de otros tipos de eritrocitos como los humanos la temperatura no es condicionante para la fagocitosis. Sin embargo, estudios realizados con hemocitos del cangrejo australiano *Parachaeraps bicarinatus*<sup>(26)</sup>, el reconocimiento (adherencia) de células de carnero previamente tratadas con suero, se incrementó incluso a 0°C, y la fagocitosis fue dependiente de una temperatura mayor a 22°C.

De acuerdo con nuestros resultados la ingestión de otros grupos de eritrocitos de vertebrados es menor, por lo cual se propone que en la actividad fagocítica mediada por la lectina en esta especie de langostino, influyen diferentes factores como son el tiempo y la temperatura. Esto sugiere, además, que existe en esta especie un doble mecanismo de reconocimiento de lo no propio, uno específico (mediado por la lectina de membrana) y el otro inespecífico.

La identificación de los azúcares de membrana se realizó mediante ensayos histoquímicos utilizando lectinas comerciales con especificidad conocida, inclusive la lectina del langostino, marcadas con biotina. Nuestros resultados nos revelaron que la membrana de los granulocitos, presenta en su glicocalix estructuras formadas particularmente por D-manosa, N-acetil-D-glucosamina y grupos N-acetil-lactosamínicos, de manera interesante solamente el 50% de las células poseen estructuras sialiladas y el ácido siálico en casi el 90% de esas células se encuentra unido por enlaces del tipo  $\alpha 2,3$  y el resto aparentemente otros a los enlaces  $\alpha 2,6$ . Estos son resultados preliminares que nos indican algunas características estructurales de la membrana de los hemocitos; desconocemos si el grado de sustituciones con ácido siálico al igual que en vertebrados tenga alguna relevancia, por ejemplo como es en el caso reportado por Lascurain y cols.<sup>(87)</sup> sobre su función en el timo murino en el cual el 90% de los linfocitos carentes de ácido siálico se encuentran en la corteza tímica y los cuales serán destruidos, en tanto que las células funcionales que serán enviadas al torrente circulatorio poseen este residuo. Por esta razón, proponemos que los estudios sobre los mecanismos de defensa del langostino

también pueden ser enfocados hacia la interacción específica de los componentes de membrana, tal como el glicocalix en otros procesos como la formación de nódulos o la encapsulación, además de la fagocitosis.

Hasta el momento ha sido difícil demostrar que las lectinas de invertebrados son proteínas inducidas por un estímulo antigénico, así como su participación como mediadores específicos de la respuesta humoral en el caso de los crustáceos. Esto, probablemente debido a la especificidad que muestran estas lectinas por ácido siálico o sus derivados, ya que existen pocos ejemplares bacterianos que presenten este carbohidrato como determinante, como es el caso de *Escherichia coli*, la cual posee ácido colomínico, que se reconoce como un polímero del ácido siálico unido con los enlaces  $\alpha 2,8$ . Sin embargo, la posición de enlace de este polímero podría cambiar en la superficie de membrana de algunos otros patógenos como los virus o protozoarios lo cual, hasta el momento aún no se ha explorado.

En nuestro estudio como un intento por identificar la posible participación de la lectina sérica en alguno de estos eventos de reconocimiento, se propuso en primera instancia identificar algún patógeno en los organismos de estudio. En el langostino se ha descrito la presencia de virus, bacterias quitinolíticas y filamentosas, diversos protozoarios, hongos e insectos<sup>(27)</sup>. En nuestro estudio aislamos de organismos que mostraban alteraciones en la cutícula patógenos bacterianos que identificados mediante pruebas bioquímicas<sup>(64)</sup> corresponden a *Bacillus cereus* y *Aeromona* sp, los cuales de acuerdo a Bautista<sup>(28)</sup> y Brock<sup>(29)</sup> son causantes de alteraciones ulcerativas del exoesqueleto de crustáceos.

Estudios sobre la capacidad aglutinante de la lectina sérica realizados con las bacterias identificadas, nos permitieron determinar que existe una interacción positiva con las bacterias aisladas así como a otras especies bacterianas como los serotipos de *Pasteurella hemolytica* biotipo A (serotipo capsular 12) y *P. multocida* serotipo capsular 9, algunas otras bacterias como *Salmonella aureus*, *S. arizona*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron reconocidas en menor proporción por la lectina. Para conocer la naturaleza de interacción entre la lectina y bacterias se identificaron dos aspectos, primero que las bacterias reconocidas presentan en común

a los carbohidratos con grupos N- y O- acetilados en las paredes y cápsulas, y un segundo aspecto la interacción de carbohidratos inhibidores de su actividad aglutinante. Estos resultados indican que en efecto, al igual que en la interacción con eritrocitos, la lectina posee especificidad por carbohidratos N-acetilados como la N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina. Sin embargo, otros glicósidos O-metilados también inhiben la actividad de la lectina, por esta razón se justifica la interacción de la lectina con los grupos bacterianos. Particularmente, en el caso de *Bacillus cereus*, esta bacteria posee en su pared polisacáridos O-metilados<sup>(68)</sup>, y de acuerdo a nuestros resultados la lectina podría interactuar con los grupos funcionales ceto presentes en los carbohidratos de los polisacáridos, lipopolisacáridos y del ácido teicoico de tales bacterias.

Hasta el momento existen pocos estudios que hayan tratado de identificar la naturaleza exacta de la interacción entre lectinas de invertebrados y las bacterias, a pesar de que se propone que este es el proceso esencial de defensa en algunas especies de animales. Por ejemplo, algunos autores como Vargas-Albores y cols.<sup>(69)</sup> y Kopacek y cols.<sup>(70)</sup>, han reportado la inhibición de lectinas de invertebrados por lipopolisacáridos bacterianos. Por otra parte la lectina aislada del *Carcinoscorpius rotunda-caudia*, Dorai y cols.<sup>(71)</sup> han demostrado esta proteína es capaz de reconocer algunas cepas bacterianas, por la interacción con el determinante 2-ceto-3-deoxioctonato, el cual está presente en los polisacáridos de pared de *E. coli*.

Diversas investigaciones para tratar de utilizar a las lectinas como marcadores fenotípicos de bacterias habían mostrado algunos resultados interesantes. Se hace notar que en esta aplicación se han utilizado lectinas que reconocen básicamente carbohidratos neutros y excepcionalmente lectinas con afinidad por azúcares N-acetilados, tal como la lectina obtenida del caracol del jardín *Helix pomatia* y la lectina purificada del germen de trigo *Triticum vulgare*<sup>(68)</sup>, las cuales reconocen N-acetil-D-galactosamina y N-acetil-D-glucosamina respectivamente. La lectina del caracol de jardín *H. pomatia* se ha determinado que reconocer bacterias Gram positivas como es *Staphylococcus aureus*<sup>(68)</sup> y la lectina del germen de trigo reconoce varios serotipos A y T de *Pasteurella hemolítica* y *P. multocida*<sup>(72)</sup>. En este sentido, la lectina sérica de *M.*

*rosenbergii* (DeMan) puede ser utilizada como una herramienta para la identificación no solo a las bacterias que infectan a este crustáceo sino también para los serotipos específicos de *Pasteurella hemolítica* biotipo A con el polisacárido capsular 12 y para *P. multocida* con el serotipo capsular 9.

En resumen, nuestros resultados podrían representar un avance importante en la caracterización de los grupos de hemocitos en invertebrados debido a que la lectina de membrana es un marcador, que podría ser utilizado para identificar plenamente las características funcionales y estructurales de un grupo definido de células como las que poseen actividad fagocítica. Esto con el objetivo de: 1) el identificar alguna otra característica fenotípica de las poblaciones celulares, 2) identificar los receptores de membrana, mediante la caracterización cualitativa de los carbohidratos presentes en los hemocitos, 3) el determinar el lugar de síntesis de la lectina y la relación que guarda con los hemocitos y 4) dada la especificidad de la lectina hacia derivados del ácido siálico podría ser utilizada como herramienta para la caracterización fenotípica de grupos bacterianos.



## PERSPECTIVAS.

Los organismos unicelulares y multicelulares se encuentran continuamente expuestos a un constante reto antigénico, por lo que deben de haber desarrollado un sistema de protección a nivel molecular que les permitiera distinguir de lo propio y no propio a nivel molecular. Este proceso de discriminación, se considera una habilidad fundamental para un organismo multicelular y unicelular que involucra una etapa primitiva de reconocimiento y, el inicio de una defensa interna para el control del crecimiento y proliferación celular.

Actualmente, el desarrollo de las investigaciones enfocadas para comprender los aspectos involucrados en las reacciones inmunes de los invertebrados, se basan en los estudios morfofuncionales y bioquímicos de los componentes de la hemolinfa como parte del sistema inmunológico.

En el caso de las lectinas, éstas son consideradas un grupo heterogéneo de proteínas complejas formadas por subunidades de alto peso molecular, las cuales se han conservado a través de la filogenia del reino animal. Particularmente la especificidad en los invertebrados está determinado hacia los grupo de carbohidratos ya sean monosacáridos u oligosacáridos. En la Figura 1, se representa mediante un árbol filogenético la especificidad de las lectinas que se manifiesta particularmente para cada Phylum de invertebrado. Debido a su especificidad por carbohidratos, las lectinas son consideradas organizadoras de macromoléculas. En el caso específico de los decápodos, la especificidad de las lectinas está dirigida principalmente hacia ácidos siálicos y son proteínas que requieren de cationes divalentes para manifestar su actividad biológica. Generalmente, estas proteínas están formadas por subunidades de alto peso molecular, lo cual podría favorecer la actividad de complejos multienzimáticos

participando de esta forma en la regulación de la metamorfosis, la alimentación y reproducción.

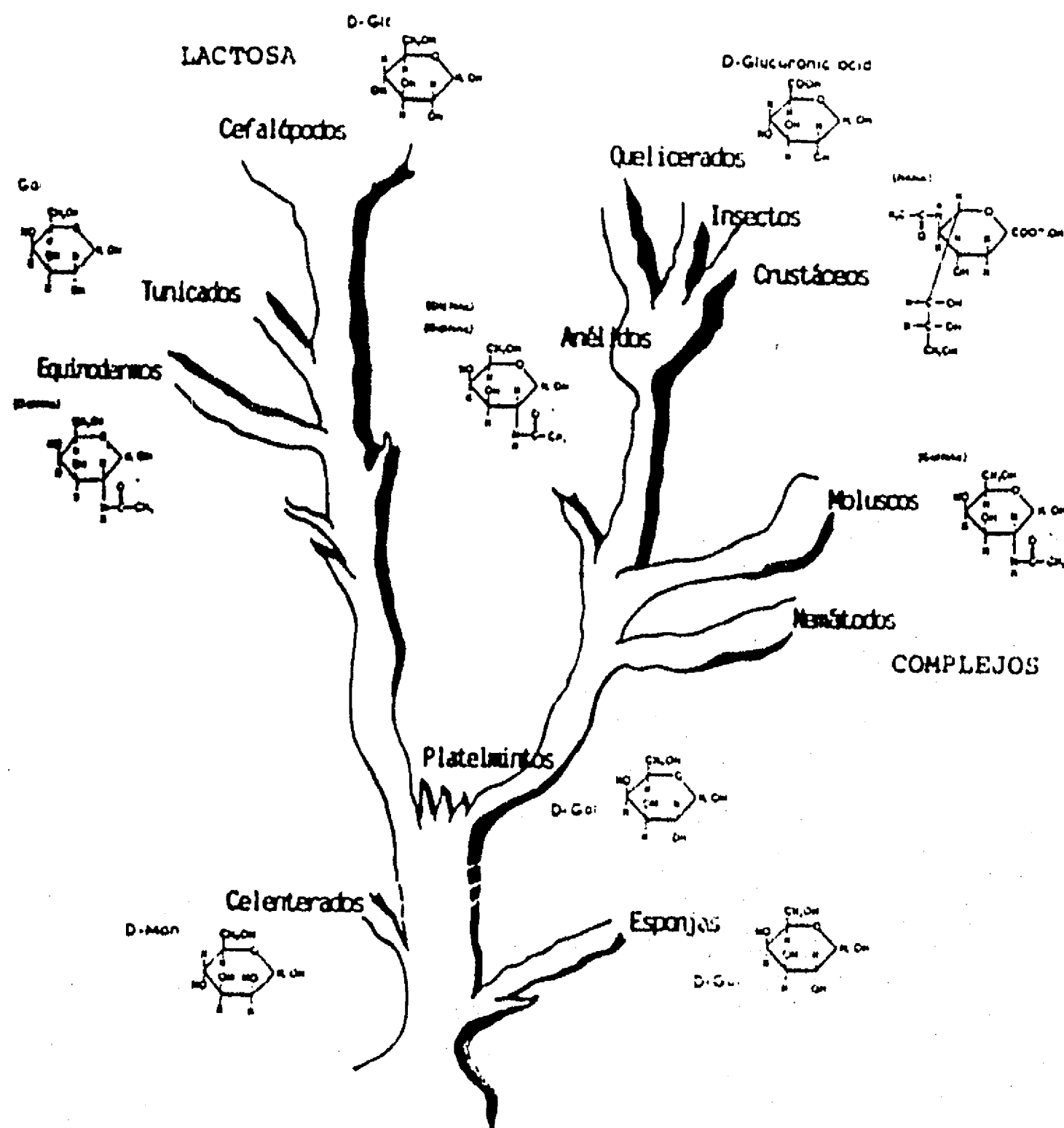


Fig. 1. Árbol filogenético del Reino Animal que representa la especificidad que presentan las lectinas aisladas de diferentes grupos de organismos, hacia los grupos de carbohidratos.

Existe una clara evidencia de que las lectinas se encuentran involucradas en el reconocimiento y defensa. Estas proteínas se han identificado en la membrana de los hemocitos que participan en la fagocitosis y en la encapsulación de antígenos. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo molecular para discriminar lo no propio. Considerando que la fagocitosis es el principal atributo de los hemocitos, proceso fundamental para todo organismo vivo, su papel en la inmunidad es de sumo interés para la inmunología comparada.

Se ha demostrado que la interacción del hemocito y el antígeno se encuentra mediada por receptores. Sin embargo, es importante considerar que además de los determinantes definidos, también son requeridos otros mecanismos no específicos como es la interacción hidrofóbica y carga superficial del antígeno, o bien la activación de un sitio enmascarado o inactivo.

Considerando que los hemocitos circulantes llevan a cabo diversas actividades fisiológicas, incluyendo la síntesis de algunos componentes de la hemolinfa, estos se encuentran correlacionados directamente con el mecanismo inmunológico. Y por lo tanto, de acuerdo con la escasa información, se ha propuesto que la síntesis de la lectina se efectúa en los plasmocitos en el caso de los insectos y, particularmente en los granulocitos para el grupo de los decápodos. Finalmente, por lo que respecta a nuestro trabajo, las evidencias aportadas sugieren de manera significativa, la presencia de una lectina de membrana, la cual posee características similares a la lectina sérica del langostino.

## FUTURO Y APLICACIONES.

Para comprender los mecanismos de inmunidad en los invertebrados e identificar los procesos de activación de los grupos celulares (los que a su vez producen diversos factores séricos mediadores de una respuesta), es necesario identificar la estructura y las características fisicoquímicas más relevantes de dichos factores, así como el identificar a las células involucradas en las reacciones inmunológicas.

Consideramos que los estudios sobre los mecanismos de inmunidad comprenden dos aspectos básicos: 1. el aislamiento y análisis estructural de las proteínas séricas y ancladas en la superficie de los hemocitos y 2. el control de la actividad funcional inmune. Ya que estos procesos son los que han dado lugar al éxito de este grupo de animales a través de la evolución.

En especies primitivas de animales, los estudios de los receptores celulares y fluidos séricos, que participan en una respuesta inmunológica, son actualmente enfocadas a la caracterización de las propiedades bioquímicas y funcionales. Esto, con la intención de correlacionar la homología estructural o funcional con respecto a las moléculas mediadoras de la especificidad y memoria en los vertebrados, considerando que la adaptación de los organismos invertebrados, se ha logrado a partir de un repertorio limitado de moléculas y factores. Por esta razón, el estudio sobre la inmunidad en este grupo de invertebrados pueden ser una herramienta para la detección, el diagnóstico y control de las enfermedades presentes en cultivos de invertebrados de importancia económica. Esto contribuye además, al conocimiento sobre la biología celular, morfofisiología y la biotecnología de los invertebrados, entre otros aspectos.

## CONCLUSIONES

- El mecanismo de inmunidad en decápodos, está mediado por factores séricos y por la participación de hemocitos circulantes.

- De acuerdo con estudios morfológicos y de actividad biológica, en los hemocitos circulantes del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan), estos fueron clasificados en: 1. hemocitos fusiformes, 2. hemocitos ovoides grandes (que comprende dos subtipos de hemocitos) y 3. hemocitos redondos pequeños.

- Los microorganismos aislados de lesiones cuticulares de los organismos del langostino (dedicados para la engorda en la zona de explotación acuícola "El Huamuchil", Jojutla: Morelos), son las bacterias: *Bacillus cereus* y *Aeromonas* sp.

- Los resultados sobre la actividad aglutinante de la lectina hacia células bacterianas demuestran un reconocimiento hacia las bacterias *Bacillus cereus* y *Aeromonas* sp. y a serotipos específicos de las bacterias *Pasteurella haemolitica* (biotipo A, serotipo capsular 12) y *P. multocida* (serotipo capsular 9); con menor afinidad reconoce también *Salmonella arizona*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, las cuales poseen en común residuos de carbohidratos N- y O-acetilados en sus lipopolisacáridos o bien formando parte del ácido teicoico.

- En el proceso de reconocimiento de lo no propio, participa la lectina sérica, la cual reconoce residuos de carbohidratos O- y N-acetilados.

- Se reporta la presencia de una lectina de membrana en los granulocitos de los hemocitos grandes ovoides, que comparte la especificidad por carbohidratos similares a la lectina sérica.

- Dada la especificidad que presenta esta lectina a los grupos acetilados, se propone su utilización para la identificación de estructuras libres o asociadas a membranas que contengan especificidad hacia tales grupos de carbohidratos.

## REFERENCIAS

1. Bumet, F.M. 1974. Invertebrate precursors to immune responses. Comp. Top. Immunobiol. 4:13-24.
2. Ratcliffe, N.A. 1989. The biological significance of immunity. Dev. Comp. Immunol. 13:273-283.
3. Parish, C.R. 1977. Simple model for self-non-self-discrimination in invertebrates. Nature. 267:711-713.
4. Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods? A review. Dev. Comp. Immunol. 6:601-611.
5. Söderhäll, K., V.J. Smith and M. W. Johanson. 1986. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated haemocyte populations of two crustaceans: evidence for cellular co-operation in the defence reactions of arthropods. Cell. Tissue Res. 245:43-49.
6. Bayne, C.J. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Bioscience. 40(10):723-731.
7. Söderhäll, K., A. Vey, and M. Ramstedt. 1984. Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 8:23-29.
8. Persson, M., A. Vey and K. Söderhäll. 1987. Encapsulation of foreign particles *in vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. Cell. Tissue. Res. 247:409-415.
9. Boucias, D.G., S.Y. Hung, I. Mazet and J. Azbell. 1994. Effect of the fungal pathogen, *Beauveria bassiana*, on the lysozyme activity in *Spodoptera exigua* larvae. J. Insect. Physiol. 40(5):385-391.
10. Coombe, D.R., P.L. Ey and C.R. Jenkin. 1984. Self/non-self recognition in invertebrates. The Quarterly Review of Biology. 59(B):231-255.

11. Hose, J.H., G.G. Martin and A.S. Gerard. 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. Biol. Bull. 178:33-45 .
12. Lanz, H., V. Tsutsumi and H. Arechiga. 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. Dev. Comp. Immunol. 17:389-397.
13. Renwranz, L.1986. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. Symp. Zool. Soc. Lond. 56:81-93.
14. Olafsen, J.A. 1988. Role of lectins in invertebrate humoral defense. Am. Fish.Soc. Special Publication. 18:189-205.
15. Vasta, G.R. 1992. Invertebrate lectins. distribution, synthesis, molecular biology, and function. In: Glycoconjugates: Edited by Howard J. Allen and E.C. Kisailus. Buffalo, New York. Pags. 593-634.
16. Du Pasquier, L. 1989. Evolution of the immune system. In: Fundamental Immunology: Edited by William E. Paul. Second Edition. Raven Press Ltd., N.Y. Pags. 139-165.
17. Van de Vyver, G., S. Holvoet and P. Dewint. 1990. Variability of the immune response in freshwater sponges. J. Exp. Zool. 254:215-227.
18. Wu, T.T. and E.A. Kabat. 1982. Fourteen nucleotides in the second complementarity-determining region of a human heavy-chain variable region gene are identical with a sequence in a human D minigene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:5031.
19. Cohen, E. 1968. Immunologic observations of the agglutinins of the hemolymph of *Limmulus polyphemus* and *Birgus latro*. Trans. N.Y. Acad. Sci. 30:427-443.
20. Brown, R., L.R. Almodovar, H.M. Bhatia and Y.W.C. Boyd. 1968. Blood group specific agglutinins in invertebrates. Jour. Immunol. 100(1):214-216.



21. Ravindranath, M.H., H.H. Higa, , E.L. Cooper and J.C. Paulson. 1985.  
Purification and characterization of an O-acetilsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. J. Biol. Chem. 260(15):8850-8856.
22. Hall, J.L. and D.T. Rowlands, Jr. 1974. Heterogeneity of lobster agglutinin erythrocyte binding.II. Specificity of agglutinin-erythrocyte binding. Biochemistry. 13(4):828-832.
23. Mohan, S., D.T. Dorai, S. Srimal and B.K. Bachhawat. 1982. Binding studies of a sialic acid-specific lectin from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda-cauda* with various sialoglycoproteins. Biochem. J. 203:253-261.
24. Drickamer, K. 1993. Recognition of complex carbohydrates by Ca<sup>2+</sup> - dependent animal lectins. Biochem. Soc. Trans. 21:456-459.
25. Mckay, D. and C.R. Jenkin. 1970. Immunity in the invertebrates: the role of serum factors in phagocytosis of erythrocytes by haemocytes of the freshwater crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 48:139-150.
26. Amirante, G.A. 1992. Probable role of induced lectins in capsule formation in *Squilla mantis* L. Boll. Zool. 59:153-158.
27. Bang, F. 1967. Serological responses among invertebrates other than insects. Fed. Proc. 26:1680-1684.
28. Bautista, C. 1988. Crustáceos. Tecnología de cultivo. Edit. Mundi-Prensa, Madrid, España. pags. 93-126.
29. Brock, J.A. 1993. A synopsis of pathology, diseases, and production problems of cultured *Macrobrachium*, with an emphasis on experiences in Hawaiian prawn farming. CRC Handbook of Mariculture. 2nd edition vol.I. Edited by McVey, J.P. Maryland, USA. Pag. 361-391.
30. Roitt, I. 1991. Essential Immunology. 7th edition. London: De. Blackwell Scientific Publications.
31. Hildemann, W.H. 1974. Phylogeny of immune responsiveness invertebrates. Life Sciences. 14:605-614.

32. McMahon, B.R. and L.E. Burnett. 1990. The crustacean open circulatory system: A reexamination. Physiol. Zool. 63:35-71.
33. Amirante, G.A. 1986. Cellular immune responses in crustaceans. Hemocytic and humoral immunity in arthropods. Edited by Gupta, A.P., J. Wiley & Sons, Inc. Pags. 61-75.
34. Smith, V.J. and K. Söderhäll. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in freshwater crayfish, *Astacus astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. Cell. Tissue. Res. 233:295-303.
35. Tsing, A., J. M. Arcier and M. Brehélin. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. Jour. Invertebr. Pathol. 53:64-77.
36. Bodammer, J.E. 1978. Cytological observations on the blood and hemopoietic tissue in the crab, *Callinectes sapidus*. I. The fine structure of hemocytes from intermolt animals. Cell. Tissue. Res. 187:79-96.
37. Williams, A.J. and P.L. Lutz. 1975. Blood cell types in *Carcinus maenas* and their physiological role. J. Mar. Biol. Ass U.K. 55:671-674.
38. Vázquez, L., F., Massó, P. Rosas, L.F. Montaña, and E. Zenteno. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea:Decapoda) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 105B, :617-623.
39. Martin, G.G., J.E. Hose, S. Omori, C. Chong, T. Hoodbhoy and N. McKrell. 1991. Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. Comp. Biochem. Physiol. 100B(3):517-522.
40. Omori, S., G.G. Martin and J.E. Hose. 1989. Morphology of hemocyte lysis and clotting in the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*. Cell. Tissue Res. 255:117-123.
41. Durliat, M. 1985. Clotting processes in crustacea decapoda. Biol. Rev. 60(4):473-498.

42. Tyson, C.J. and C.R. Jenkin. 1974. Phagocytosis of bacteria *in vitro* by haemocytes from the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*) AJEBAK 52:341-348.
43. Goldenberg, P.Z., E. Huebner and A.J. Greenberg. 1984. Activation of lobster hemocytes for phagocytosis. J.Inv.Pathol. 43:77-88.
44. Paterson, W.D., J.E. Stewart, and B.M. Zwicker. 1976. Phagocytosis as a cellular immune response mechanism in the american lobster, *Homarus americanus*. J. Invertbr. Pathol. 27:95-104.
45. Mckay, D. and C.R. Jenkin. 1969. Immunity in the invertebrates.II. Adaptative immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*). Immunology. 17:127-137.
46. Cornick, J.W. and J.E. Stewart. 1968. Interaction of the pathogen *Gaffkya homari* with natural defense mechanisms of *Homarus americanus*. J. Fish. Res. Bd. Canad. 25:695-709.
47. Pauley, G.B. 1973. An attempt to immunize the blue crab, *Callinectes sapidus*, with vertebrate red blood cells. Experientia 29(2):210-211.
48. Itami, T. and Y. Takahashi. 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet. J. Aquatic Animal Health. 3:151-152.
49. Johansson, M.W. and K. Söderhäll. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today. 5(6):171-176
50. Ratner, S. and S.B. Vinson. 1983. Phagocytosis and encapsulation: cellular immune responses in arthropoda. Amer. Zool. 23:185-194.
51. Johansson, M.W. and K.. Söderhäll. 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. J. Cell. Biol. 106:1795-1803.
52. Aspán, A. and K., Söderhäll. 1991. Purification of prophenoloxidase from cryfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. Insect. Biochem. 21(4):363-373.
53. Doyle, R.J. 1994. Lectin-microorganism interactions. Edited by Doyle R.J. and M. Slifkin. Marcel Dekker. Inc. USA.

54. Hunt, S. 1970. Polysaccharide-protein complexes in invertebrates. Edit. Academic Press. Inc. London and N.Y. Pag. 179-227.
55. Renwranz, L. 1983. Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defense reactions: the immuno-biological importance of carbohydrate-specific binding molecules. Dev. Comp. Immunol. 7:603-608.
56. Amirante, G.A., G. Valle and 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.
57. Cassels, F.J., J.J. Marchalonis and G.R. Vasta. 1986. Heterogeneous humoral and hemocyte-associated lectins with N-acylaminosugar specificities from the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. Comp. Biochem Physiol. 85B(1):23-30.
58. Peebles, J.B. 1977. A Rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. 12:173-180.
59. Söderhäll, K., and V.J. Smith. 1983. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. Dev. Comp. Immunol. 7:229-239.
60. Van Harrevald, A. 1936. A physiological solution for fresh-water crustaceans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 34:428-432.
61. Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17:208-212.
62. Seaman, G.V.F., R.J. Knox, F.J. Norot and D.H. Reagan. 1977. Red cell again. I. Surface charge density and sialic acid content of density-fractionated human erythrocytes. Blood 50:1001-1011.
63. Shinozuka, T., S. Takei, J.I. Yanagida, H. Watanabe and S. Ohkuma. 1988. Comparative study on the main membrane-surface sialoglycopeptides released from young and old human erythrocytes with trypsin. Comp. Biochem. Physiol. 89B:309-315.

64. Koneman, E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell and H.M. Sommers (editors). 1983. Diagnóstico microbiológico. Edit. Médica, Panamericana. Buenos Aires Argentina. Págs. 13-45.
65. Mix, M.C. and A.K. Sparks. 1980. Hemocytes classification and differential counts in the dungeness crab, *Cancer magister*. J. Invert. Pathol. 35:134-143.
66. Renwantz, L., W. Schancke, H. Harm, H. Erl, H. Leibsch and J. Gercken. 1981. Discriminative ability and function of the immunobiological recognition system of snail *Helix pomatia*. J. Comp. Physiol. 141B:477.
67. Lascurain, R., R. Chávez, P. Gorocica, A. Pérez, L.F. Montaña and E. Zenteno. 1994. Recognition of a CD4<sup>+</sup> mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amaranthus leucocarpus* lectin. Immunology. 83:410-413.
68. Slifkin, M. and R.J. Doyle. 1990. Lectins and their application to clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 3(3):197-218.
69. Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán and J.L. Ochoa. 1993. A lipopolysaccharide-binding agglutinin isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 104B:407-413.
70. Kopacek, P., L. Grubhoffer and K. Söderhäll. 1993. Isolation and characterization of a hemagglutinin with affinity for lipopolysaccharides from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Dev. Comp. Immunol. 17:407-418.
71. Dorai, D.T., S. Srimal, B.T. Mohan and T.S. Balgenesh. 1982. Recognition of 2-keto-3-deoxyoctonate in bacterial cells and lipopolysaccharides by the sialic acid binding lectin from horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicaudia*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104:141-147.
72. Craft, D.L., M.M. Chengappa and G.R. Carter. 1987. Differentiation of *Pasteurella haemolytica* biotypes A and T with lectins. Veterinary Record 120:393.

MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF HEMOCYTES FROM THE FRESHWATER  
PRAWN *Macrobrachium rosenbergii*.

Lorena Vázquez<sup>1</sup>, Armando Pérez<sup>2</sup>, Diana Millán<sup>2</sup>, Concepción Agundis<sup>3</sup>, Gary  
Martin<sup>4</sup>, Edwin L. Cooper<sup>5</sup> and Edgar Zenteno<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biológicas Félix Frías,  
Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, 62210, México.

<sup>2</sup>Departamento Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM., 04510  
México, <sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades  
Respiratorias, Tlalpan, D.F. 40085 México. <sup>4</sup>Department of Biology, Occidental  
College, Los Angeles, California, 90041, USA. <sup>5</sup>Department of Anatomy and Cell  
Biology, UCLA Medical Center, Los Angeles, California, 90095 USA. <sup>6</sup>Departamento  
de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM., 04510 México.

Corresponding author:

L.Vázquez. PO Box 70159

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM

04510 México D.F. Fax (5)616.24.19.

Running title: *Macrobrachium rosenbergii* circulating hemocytes

## ABSTRACT

Classification of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan) hemocytes was performed based on morphological features of cells in suspension and adherent cells, analyzed by light and electron microscopy. Phagocytosis assays were also performed to establish a functional criterion. Based on our results, we propose the presence of three major cell types: 1) fusiform hemocytes, representing the most abundant group of hemocytes, of this some undergo autolysis, with few or without cytoplasmic granules; 2) large ovoid hemocytes, the most heterogeneous group of cells, size and density of their granules varies, suggesting different functional properties. This group of cells exerts phagocytic activity, and 3) small rounded hemocytes, the smallest size group, which probably corresponds to the undifferentiated group of cells.

## INTRODUCTION

Blood cells and seric factors in arthropods play an important role in defense mechanisms against parasites and pathogenic or non pathogenic microorganisms that might enter the hemocele through wounds in the cuticle<sup>1-3</sup>. In decapod crustaceans, circulating hemocytes have received considerable attention as defense mediators against microorganisms. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that hemocytes participate in phagocytic activity<sup>4,5</sup>, in the activation of the prophenoloxidase system through endogenous proteins<sup>6,7</sup> and in cellular encapsulation and nodulation<sup>8,9</sup>. Morphological studies performed on circulating cells from decapods have demonstrated the existence of two types of circulating cells: the hyaline hemocytes, which possess few cytoplasmic granules, and the granular hemocytes, containing abundant granules; moreover, this group of cells has been subdivided in granulocytes that contain small granules, and those with large and refractile granules<sup>10-12</sup>. Due to the encountered discrepancies, it has been difficult to establish the specific role of these cellular groups in defense reactions. Considering that hemocyte classification could be useful to monitor and evaluate the health of crustaceans, the aim of this work was to characterize morphologically and propose a classification for the hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*, as a representative organism of freshwater decapods.



## MATERIAL AND METHODS.

### ANIMALS

Freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan) were obtained from the aquaculture farm "El Huamuchil", Jojutla; state of Morelos, México and kept in aerated tanks in the laboratory. Only molt stage C animals, identified according to the characteristics described by Peebles<sup>13</sup>, were used.

### REAGENTS

All reagents of analytical grade were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).

### CELL PREPARATION

Assays were made in cells obtained from the hemolymph aseptically withdrawn from the pericardial sinus with an 1 ml syringe and a 1.5-in (21 v) gauge needle. The hemolymph was used to make different preparations: 1) Cell suspensions: the hemolymph was mixed immediately with a fixing solution (1:6 v/v) of 1.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.8) and a crustacean anticoagulant solution (0.45 M NaCl; 0.1 M glucose; 30 mM sodium citrate; 26 mM citric acid and 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid) (pH 4.5),<sup>14</sup> at a 1:1 (v/v) ratio. 2) Adherent cells: hemolymph was obtained and mixed with an anticoagulant solution (1:6 v/v) and washed in Van Harrevald's solution (VHS) (0.2 M NaCl; 0.1 M CaCl<sub>2</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM KCl; 2 mM NaHCO<sub>3</sub>), (pH 7.4)<sup>15</sup>. Cellular viability was tested by the trypan blue dye exclusion method (>90% viability); the number of total hemocytes was counted with an hemocytometer. Cells were then incubated for 30 min at room temperature (22±2 °C) on slides or coverslips covered with Poly-L-lysine (10 mg/ml of water). Non-adherent hemocytes were eliminated by washing with the VHS. Adherent cells were analyzed by phase contrast microscopy.

## MORPHOLOGICAL MEASUREMENTS

Suspended hemocytes were measured with an optical microscope (Olympus, BH-2), using a 100X objective and a 10- eyepiece micrometer (1:100  $\mu\text{m}$  scale). We determined the average diameter and length average of 100 cells, and the percentage for each type of hemocyte.

## TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM)

Withdrawn hemolymph was mixed immediately in the anticoagulant-fixative solution, at a 1:10 v/v ratio. Hemocytes were then pelleted for 5 min at 200 xg, at room temperature. The supernatant was decanted and the pellet was fixed with a solution of 1.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4), for 2h at 4°C. Afterwards, the pellet was washed in 0.1M sodium cacodylate buffer at 380 xg rpm at 4°C, postfixed in 1% osmium tetroxide for 45 min at 4°C, and dehydrated in gradually increasing ethanol concentrations until reaching propylene oxide, and embedded in Araldite 6005. Ultrathin sections were cut with a diamond knife, contrasted according to Reynolds<sup>16</sup> and observed under an EM-109 ZeissTEM.

## SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

Microslides with adherent hemocytes and cell suspensions obtained as described (see above) were processed for SEM. Briefly, specimens (adherent cells) were fixed in 1.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 30 min at 4°C. Then, the cells were washed three times in the same buffer, and postfixed with 1% osmium tetroxide for 15 min at 4°C, dehydrated in graded ethanol concentrations until critical point drying was achieved and observed under a DSM 950 SEM.

## BIOLOGICAL FUNCTIONS

Phagocytosis of hemocytes. Hemocytes were obtained as described above, incubated without fixative solutions in flat-bottom culture plates (Falcon Plastics, USA), non-adherent hemocytes were eliminated by washing with the VHS. Chicken erythrocytes, obtained in anticoagulant solution (3.8% sodium citrate in a 0.9% NaCl), and washed three times (in 0.9% NaCl solution) by centrifugation at 530 x g 10 min at 4°C; erythrocytes were added to the hemocytes monolayer at a ratio of 10:1 (erythrocyte/hemocyte) for 30 min at 25°C in a humidified chamber. Non-phagocytosed erythrocytes were discarded by exhaustive washing with VHS. The hemocyte monolayers were then fixed in 1.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.8), during 1 h at room temperature and then stained with hematoxylin-eosin (H&E) (hematoxylin, 1 min; eosin, 4 sec). These preparations were observed under differential-interference-contrast microscopy CID (Nomarski) using a Zeiss photomicroscope.

## RESULTS

Classification of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* was achieved by light and electron microscopy, and the cell population responsible for the phagocytic activity was identified. Morphologically three main types of hemocytes were observed in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: 1) spindle or fusiform cells (68.2%); 2) large ovoid cells (23.2%), and 3) small rounded cells (8.6%).

**Fusiform hemocytes.** The most abundant type of circulating hemocytes were fusiform or spindle in shape and showed diverse sizes (Table 1) as observed in DIC (Nomarski) (Fig. 1 (F) ). The elongated nucleus was located centrally, but many cells showed an eccentric location and therefore had only one sharp end. The cytoplasm of fusiform hemocytes contained few large granules, but; it was not rare to observe cells without cytoplasmic granules. Fusiform cells were clearly identified under TEM (Fig. 3a-b). The elongated nucleus had an irregular outline with abundant nuclear envelope-associated heterochromatin. Perinuclear cisternae were always evident. The cytoplasm was characterized by the presence of many spherical shaped, electron-dense granules surrounded by a membrane. Rod-shaped granules were also observed, more electron-dense than the former, but scarce and located in the vicinity of the plasma membrane. A noteworthy feature of fusiform hemocytes was the presence of large cytoplasmic vesicles, irregular in shape, showing granular and weak electron-dense contents. Other cytoplasmic organelles were poorly developed. The rough endoplasmic reticulum (rer) was observed as narrow and very widespread cisternae, particularly in cells with eccentrically placed nucleus and a cytoplasm with poorly developed ultrastructural features as compared to typical fusiform hemocytes. Scanning electron microscopy (SEM) showed that the fusiform hemocytes from cell suspension samples had a folded (rough) aspect, but those from adherent cell preparations showed a smooth cell surface or with some filipodia and lamellipodia-like processes of varying length to attached to the surface of the glass slide (Fig. 8a-b).

Examination of fresh hemolymph showed few of these cells, probably due to cytolysis in some cells, which occurs in less than 60 sec.

Large ovoid hemocytes. Include the 23.2% of suspended cells examined by DIC. Structurally, they were the most heterogeneous ones from all the circulating cells, characterized by the presence of numerous cytoplasmic granules. Heterogeneity of these cells was confirmed with TEM, indicating that large rounded hemocytes of *M. rosenbergii* could be formed by two subtypes of granular cells (Granulocytes). Subtype I which contained an irregular or ovoid eccentric nucleus, the heterochromatin packed and associated to the nuclear envelope. Spherical electron-dense granules are distributed in the cytoplasm and only few rod-shape granules and clear electron-lucent vesicles were also observed. Granules and vesicles increased their number and size, forming clusters with a peculiar distribution. The rer is well developed and free ribosomes were also recognized (Fig. 5a-c). Subtype II of granulocytes possesses bigger and scarce granules; these hemocytes were characterized by a cytoplasm filled almost with spherical electron-dense granules, very electron-dense rod-shaped granules were also identified as well as few irregular and regular electron-lucent vesicles (Fig. 6a-b). The cytoplasmic inclusions observed in the second type of large granulocytes differ from those observed in the former type: both granule types are more abundant and slightly larger and, electron-lucent vesicles are smaller and scarce. In addition, clusters or clumps of particular inclusions are not formed in large granulocytes; moreover granules and vesicles were homogeneously distributed in cells that possess elongated and anfractuous nuclei (Fig. 6a), whereas in cells with eccentric nuclei, inclusions had a yuxtannuclear location (Fig. 6b). The rer was well-developed and numerous free ribosomes also filled the cytoplasm. The pleomorfism shown by large ovoid hemocytes was poorly evidenced in cell suspensions analyzed with SEM (Fig. 2b (L) ). However, examination by phase contrast microscopy, after adherence to coverslips, revealed that granulocytes undergo extraordinary changes characterized by spreading and flattening of the cell soma, formation of pseudopodia and fillipodia that radiated outward from the cytoplasm (Fig. 7a-d). Frequently, nuclei

were observed surrounded by a clear vesicular zone and numerous granules (also found inside pseudopodia).

In some very flattened and almost rounded cells, cytoplasmic inclusions had a juxtannuclear location, next to the formed filipodia. Although granulocytes expressed changes in size and shape, the second subtype of large granulocytes had a more prominent formation of filopodia and pseudopodia, which interestingly, were filled by numerous granules. SEM revealed adherent hemocytes with a smooth central dome and uneven degrees of periferally flattened cytoplasm; most hemocytes showed long and slender filipodia similar in length (Fig. 9a-c). More extended and flat cells had short and thorny processes radiating outward and upward, towards the cellular edge. Some cells, probably the second type of large granulocytes, had upward directed filipodia emerging from the central dome. These cells had more prominent pseudopodia and longer filipodia, but were unequal in length (Fig. 9b-d).

Small rounded hemocytes. The third type of circulating hemocyte population, they were small and rounded in shape when observed by DIC (Fig. 1 (S) ). They were smaller than fusiform cells but also had a high nucleocytoplasmic ratio, and contained none or scarce cytoplasmic granules (Table 1). TEM showed that the nucleus of the small hemocytes is centrally placed, with evident perinuclear cisternae and abundant nuclear envelope-associated heterochromatin. The cytoplasm contained a well-developed rer, but few of the other organelles (Fig. 4). Cytoplasmic granule-like structures were occasionally observed; they present electron-dense dilated rer cisternae. Small hemocytes showed several pseudopodia, which were not observed by SEM in hemocyte suspensions, but were well-developed in adherent cell preparations, showing a polarized morphology in regard to pseudopodia and filipodia (Fig. 8c).

Phagocytosis assay. Adherent cells used for the phagocytosis assay were analyzed by DIC microscopy and showed some morphological features, in addition to those described above, due to the presence of chicken erythrocytes (Fig. 10a-c). These findings include: more flattening of the cells, broad pseudopodia, perinuclear

were observed surrounded by a clear vesicular zone and numerous granules (also found inside pseudopodia).

In some very flattened and almost rounded cells, cytoplasmic inclusions had a juxtannuclear location, next to the formed filipodia. Although granulocytes expressed changes in size and shape, the second subtype of large granulocytes had a more prominent formation of filopodia and pseudopodia, which interestingly, were filled by numerous granules. SEM revealed adherent hemocytes with a smooth central dome and uneven degrees of periferally flattened cytoplasm; most hemocytes showed long and slender fillipodia similar in length (Fig. 9a-c). More extended and flat cells had short and thorny processes radiating outward and upward, towards the cellular edge. Some cells, probably the second type of large granulocytes, had upward directed fillipodia emerging from the central dome. These cells had more prominent pseudopodia and longer fillipodia, but were unequal in length (Fig. 9b-d).

Small rounded hemocytes. The third type of circulating hemocyte population, they were small and rounded in shape when observed by DIC (Fig. 1 (S) ). They were smaller than fusiform cells but also had a high nucleocytoplasmic ratio, and contained none or scarce cytoplasmic granules (Table 1). TEM showed that the nucleus of the small hemocytes is centrally placed, with evident perinuclear cisternae and abundant nuclear envelope-associated heterochromatin. The cytoplasm contained a well-developed rer, but few of the other organelles (Fig. 4). Cytoplasmic granule-like structures were occasionally observed; they present electron-dense dilated rer cisternae. Small hemocytes showed several pseudopodia, which were not observed by SEM in hemocyte suspensions, but were well-developed in adherent cell preparations, showing a polarized morphology in regard to pseudopodia and fillipodia (Fig. 8c).

Phagocytosis assay. Adherent cells used for the phagocytosis assay were analyzed by DIC microscopy and showed some morphological features, in addition to those described above, due to the presence of chicken erythrocytes (Fig. 10a-c). These findings include: more flattening of the cells, broad pseudopodia, perinuclear

vacuolation, numerous filipodia and reduced number of granules. Phagocytic hemocytes had well-developed pseudopodia and fillipodia; deformed nuclei and internalized erythrocytes were encircled by large and numerous "vacuoles", but none or very scarce granules could be observed (Fig. 10d-f). As indicated the phagocytosis activity is exerted by the large ovoid hemocytes. Regarding the shape of phagocytic cells, they were similar to the large ovoid granulocytes subtype I as observed by phase contrast microscopy in adherent cell preparations and seem to contain abundant granules. However, the paucity of these cytoplasmic inclusions was noticeable.



## DISCUSSION

ESTA TESIS  
SALIR DE LA BIBLIOTECA  
NO DEBE

Classification of decapod hemocytes is based on morphological criteria, determined by light and electron microscopy, cytochemical tests, and studies on cell function. In many reports, hemocytes from crustaceans have been grouped in two types: hyaline and granular hemocytes. In some species, such as the spiny lobster *Panulirus interruptus*<sup>4</sup> the hyaline cells or agranular hemocytes are the most abundant cellular group comprising about 56%; when examined by phase contrast microscopy they are generally ovoid in shape, smaller than granulocytes, with a higher nucleocytoplasmic ratio, and particularly in this species with few large granules, whereas in the American lobster *Homarus americanus*<sup>4</sup>, this type of cells represents 21% of the circulating hemocytes but has numerous smaller granules. In both species, *P. interruptus* and *H. americanus*, the most distinctive feature of their agranular cells is that they stain positively with sudan black showing a dark nucleus, the reaction to acid phosphatase is rare, and they have negative prophenoloxidase activity. Tsing et al.<sup>10</sup> have suggested that the morphological classification is correct only in studies performed by light microscopy, because hemocytes without granules are very scant in the blood of *P. japonicus*. These authors avoid the term hyaline hemocyte and have proposed to classify the hemocytes into three main categories: undifferentiated hemocytes, hemocytes with small granules and hemocytes with large granules. It has been considered that in *P. japonicus*<sup>10</sup> the true agranular hemocytes comprise 58% of the total hemocytes. Although they show natural autolytic activity, this type of cells only appears at the site of an injury. The undifferentiated hemocytes from *P. japonicus* represent 10% of the total hemocytes and they are characterized by the presence of numerous free ribosomes, in the cytoplasm, a moderately developed rough endoplasmic reticulum which sometimes contains small rounded cytoplasmic granules, membrane limited and uniformly opaque to electrons. Reaction to acid phosphatase and prophenoloxidase activity is always negative for these cells.

The crustacean granular hemocytes characteristically contain abundant granules, their size and number vary greatly. This type of cells is subdivided in two types: 1) Small granular or semigranulocytes (comprising 29% in *P. interruptus* and 60% of the total cells in *H. americanus*<sup>4</sup>), with a small nucleus and many cytoplasmic granules<sup>4</sup>, which are always of spherical shape in *P. japonicus*<sup>10</sup> (in this species this subtypes comprises 18% of the total hemocytes); surrounded by a membrane, and characterized by the presence of small vesicles which are electron-dense in content; abundant free ribosomes and the rer is developed in narrow but elongated cisternae. The prophenoloxidase activity is not confined to cytoplasmic organelles or vesicles (and especially to the typical granules), the acid phosphatase enzyme has been observed mainly in this type of cell, this activity has been related to the endocytotic capacity of these hemocytes. 2) The large granular hemocytes, also defined as refractile cells by Hose *et al.*,<sup>4</sup> which are recognized by the presence of large granules, whereas small granule hemocytes may contain both large and small granules. This cellular type comprises 9.8% in *P. interruptus*, 16% in *H. americanus*, and 12% of the total hemocytes in *P. japonicus*<sup>10</sup>. Particularly in the latter organism, the cells have been described as ovoids with an oval nucleus that occupies only a small part of the cellular volume. They also possess dense heterochromatin masses closer to the nuclear envelope; the cytoplasmic granules are often numerous and with different shapes (ovoid, spindle-shaped, but rarely spherical); they are always membrane bounded generally possessing an homogeneous electron-dense content. Their cytoplasm contains few free ribosomes and their rer is little developed and mitochondria are scant<sup>10</sup>. The cytochemistry of large granular hemocytes, in *P. japonicus*, does not show any reaction for acid phosphatase, however, prophenoloxidase activity has been evidenced. Other species of penaeids, such as the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis*<sup>11</sup>, show prophenoloxidase activity limited to granules, but the intense activity changes according to the molt stage (intense activity in molt stage D and less in intermolt stage).

In this work, we classified the circulating hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, a species economically important in many of the in world-wide freshwater farms. Based on morphological characteristics of cell suspensions and adherent cells analyzed by light microscopy, transmission electron microscopy, and scanning electron microscopy, we propose the presence of three main cell types: 1) fusiform hemocytes, 2) large ovoid hemocytes, and 3) small rounded hemocytes. Our proposition is supported by the fact that all analyzed hemocytes show either few or many granules, which difficults their classification in classical hyaline and granular hemocytes; we consider that another terminology to classify the hemocytes from freshwater prawn could be useful as well as for species that lack large or refractile granular hemocytes. *M. rosenbergii* (Palaemonidae) belongs phylogenetically to the Order Decapoda; it is an interesting species, since they do not present the typical morphology in the large granular hemocytes (refractile cells) reported for other decapod species, such as shrimp (*Penaeus monodon*)<sup>10</sup> or lobster (*Homarus americanus*),<sup>4</sup> and crayfish (*Procambarus clarkii*)<sup>17</sup>.

At present, information related to the classification of hemocytes seems to be controversial. Although the presence of the three main groups of hemocytes seems to be characteristic for decapods, we consider that each species possesses different morphological features: 1) Fusiforme hemocytes from freshwater prawn (the most abundant group of cells) have an eccentric location of the nucleus, with the nuclear envelope-associated heterochromatin and the cytoplasm containing few or none electron-dense granules surrounded by a membrane; however the main characteristic of fusiform hemocytes is the presence of large cytoplasmic vesicles, irregular in shape, showing granular and weak electron-dense contents. These characteristics are similar those of the undifferentiated hemocytes reported in *P. japonicus*<sup>10</sup>. Fusiform cells in the freshwater prawn, which lack cytoplasmic granules, probably have close related functions to those reported for hyaline cells from the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*<sup>5</sup> and the spiny lobster *Panulirus interruptus* (Palinuridae). 2) The second type of hemocytes from freshwater prawn are the large ovoid hemocytes or granulocytes,

they are characterized by the presence of numerous cytoplasmic granules. We have divided these cells in subtypes I and II, considering their pleomorfism in granules, vesicles, as well as in the nucleus. The granulocytes represent the main cellular line of defense, due to the participation of the prophenoloxidase system <sup>14,18</sup> and their cytotoxic and phagocytic activity<sup>4,5</sup>.

The third type of hemocytes from freshwater prawn are the small rounded cells. We consider that this type of hemocytes corresponds to undifferentiated cells, since their cytoplasmic organelles are very scarce and, compared with other hemocytes, are ultrastructurally, the most simple cells. However, they are adherent cells with spreading polarized pseudopodia and fillipodia, suggesting that small rounded hemocytes could be the precursors of phagocytic cells.

To summarize, we performed the morphological characterization of *M. rosenbergii* hemocytes; our results deal with the hypothesis that granulocytes are the most evolutioned cells from the circulant hemocytes, since they exist in three differentiation stages: large ovoid granulocytes represented by subtype I and the two differentiation stages of subtype II, based on the type and structural features observed in cytoplasmic granules and in the condensation of nuclear chromatin observed in this group of hemocytes. We are far from solving the final classification of hemocytes from this crustacean, and suggest that this problem should probaly be solved by correlating the structural and functional characteristics with phenotypic cell markers.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the personnel from "El Huamuchil" Aquaculture Farm for the specimen supply. Technical assistance by Armando Zepeda and Tomás Cruz, from the Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM, and Miss B. Alicia Montoya Jimenez, from the Departamento de Patología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, SSA, is deeply acknowledged. This work was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (REF: N9201/D0006 and D0009 México) and PAPIIT-UNAM, México.

Table 1. Morphological measurements of the three hemocyte types from the freshwater prawn.

Hemocyte type	Fusiform	Large Ovoid	Small rounded
	X SD	X SD	X SD
Length ( $\mu\text{m}$ )	$31.2 \pm 12$	$24.7 \pm 8$	$13.7 \pm 5$
Width ( $\mu\text{m}$ )	$4.8 \pm 2$	$8.9 \pm 4$	$7.5 \pm 2$

Measures were performed in cell suspensions under optical microscopy (Olympus, BH-2) using a ruler with a 1:100  $\mu\text{m}$  scale, with a 100X objective.

Table 2. Summary of the biological function of freshwater prawn hemocytes

Hemocytes	Biological
Fusiform hemocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>-probably autolytic activity</li> <li>- non-spreading cells</li> <li>- attached on the surface through short lamellipodia and fillipodia</li> </ul>
Large ovoid hemocyte.	
Subtype I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- adherent cells</li> <li>- spreading and formation</li> </ul>
Subtype II	<ul style="list-style-type: none"> <li>pseudopodia and fillipodia</li> <li>- probable phagocytic activity</li> <li>- adherent cells</li> <li>- spreading and formation of pseudopodia and fillipodia</li> <li>- phagocytosis activity (more subtype II)</li> </ul>
Small rounded hemocytes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- probably autolytic activity</li> <li>- adherent cells</li> <li>- polarized spreading of pseudopodia and fillipodia</li> </ul>



Fig. 1. Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hemocytes. Nomarski differential-interference-contrast microscopy of a suspended cell preparation, unstained, hemolymph. F. fusiform hemocytes; L. large ovoid hemocytes; S. small rounded hemocytes. Cytoplasmic granules are easily identified in L and F. X1260.

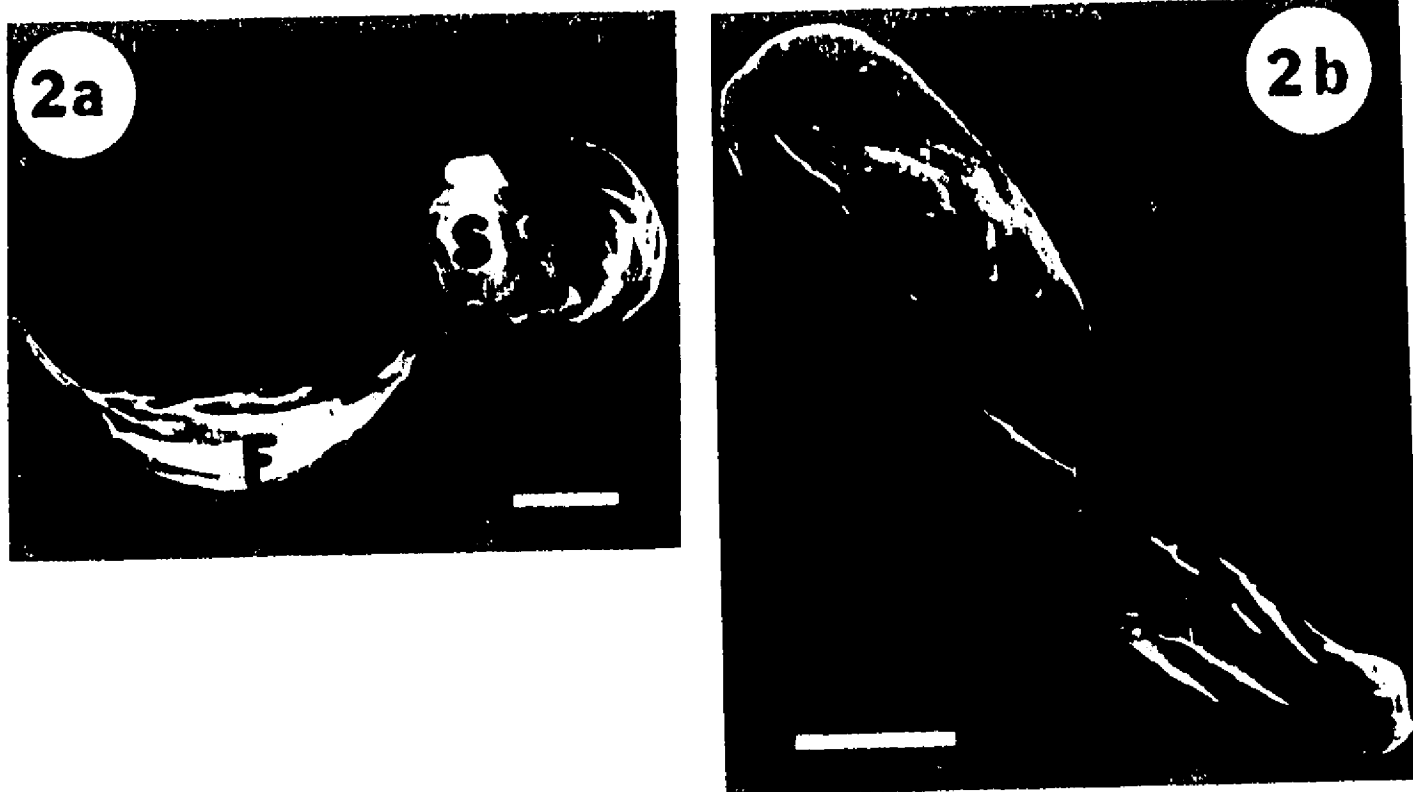


Fig. 2. (a-b). Hemocytes of *Macrobrachium rosenbergii*. The hemolymph was directly collected in glutaraldehyde/anticoagulant solution, as described under Methods, and processed for SEM. Note the fusiform (F), large ovoid (L) and small rounded (S) hemocytes. Bar= 5  $\mu$ m.



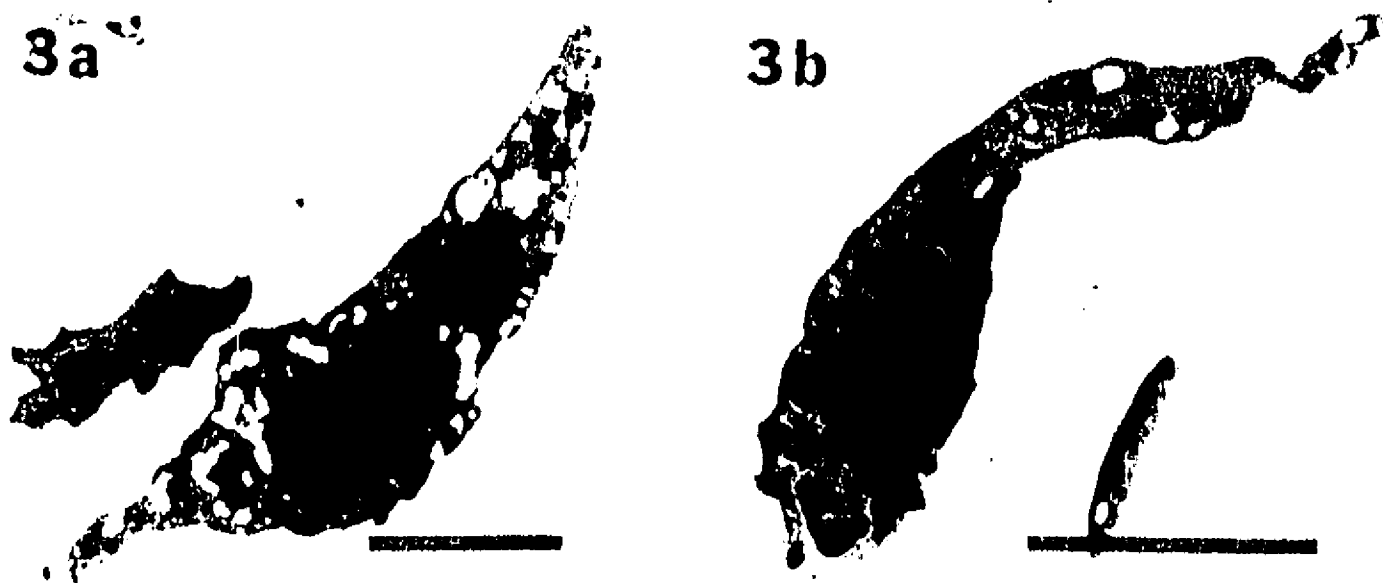


Fig. 3a. TEM of freshwater prawn fusiform hemocytes fixed immediately. Note that typical fusiform cells, the most abundant circulating hemocytes, contain many cytoplasmic inclusions particularly large cytoplasmic vesicles, irregular in shape, with electron-lucent vesicles. Fig. 3b represents a non-typical fusiform hemocyte that possesses few cytoplasmic inclusions and an eccentric loated nucleus. Bar= 5 $\mu$ m.

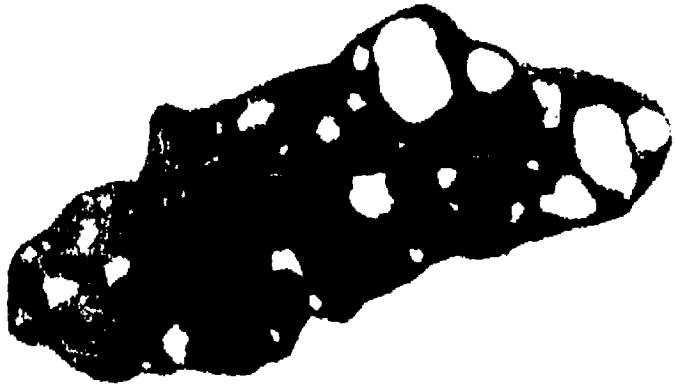


Fig. 4. TEM of a small rounded hemocyte of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Note the high nucleocytoplasmic ratio and the absence of cytoplasmic inclusions. Ultrastructurally, these cells are the simplest circulating hemocytes. Bar= 2 $\mu$ m.

5a



5b

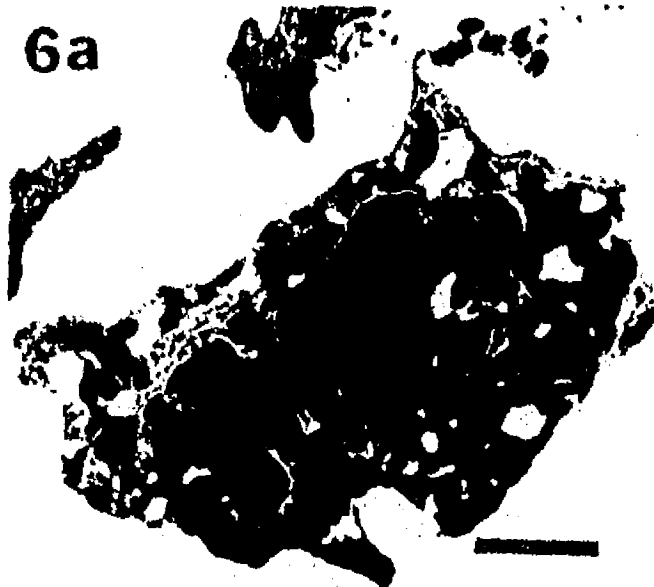


5c



Fig. 5. (a-c). TEM of large subtype I ovoid hemocyte just extracted and fixed immediately. Compare the changes in nucleocytoplasmic ratio, number, aspect, and the characteristic distribution of electron-dense cytoplasmic granules and spherical electron-lucent vesicles. Bar|= 2 $\mu$ m.

6a



6b



Fig. 6. (a-b). TEM of subtype II large ovoid hemocytes fixed immediately. These bigger and scarce circulating hemocytes, are characterized by homogeneously distributed spherical and rod-shaped electron-dense granules (6a). In addition, scarce electron-lucent vesicles are smaller than subtype I. Some cells with eccentric nucleus had yuxtannuclear clusters of granules (6b). Bar= 2 $\mu$ m.

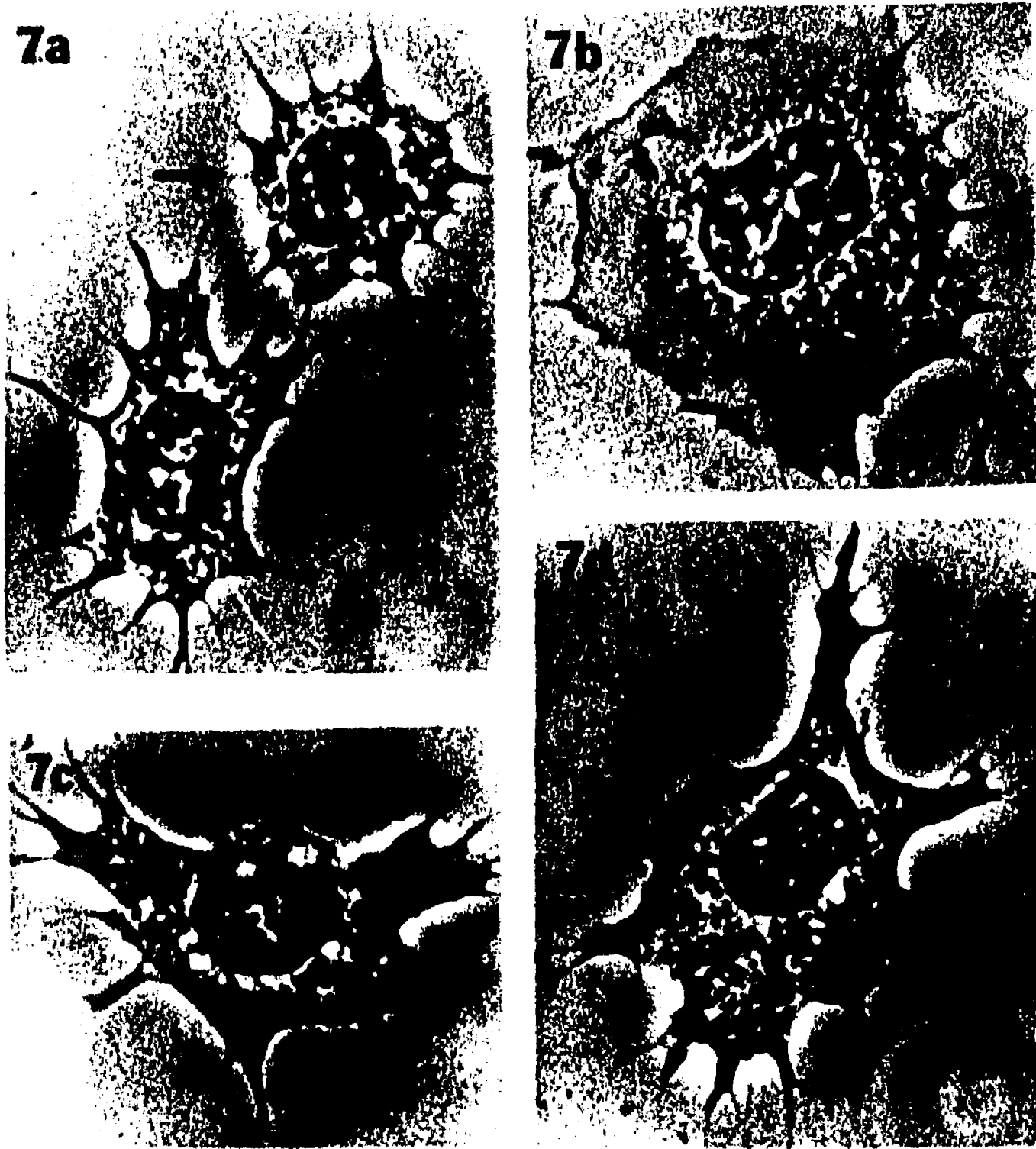


Fig. 7. (a-d). Phase contrast microscopy of unstained freshwater prawn hemocytes adherent preparation. Note the extraordinary pleomorfism of adherent cells. Homogeneous perinuclear distribution of granules and vesicles was observed in cells with long and slender outward radiated fillipodia (7a, arrow); granules had a yuxtannuclear position in very flattened cells with short and thorny fillipodia (7b). The cells of Figs. 7a (arrow) and 7b are probably similar to subtype I of large oval hemocytes of Fig. 5a and c, respectively. Hemocytes with more prominent formation of fillipodia and pseudopodia (filled by numerous granules) and nucleus surrounded by a clear vesicular zone (7c, d) are equivalent to subtype II of large oval hemocytes of Fig. 6a,b, respectively X1000.

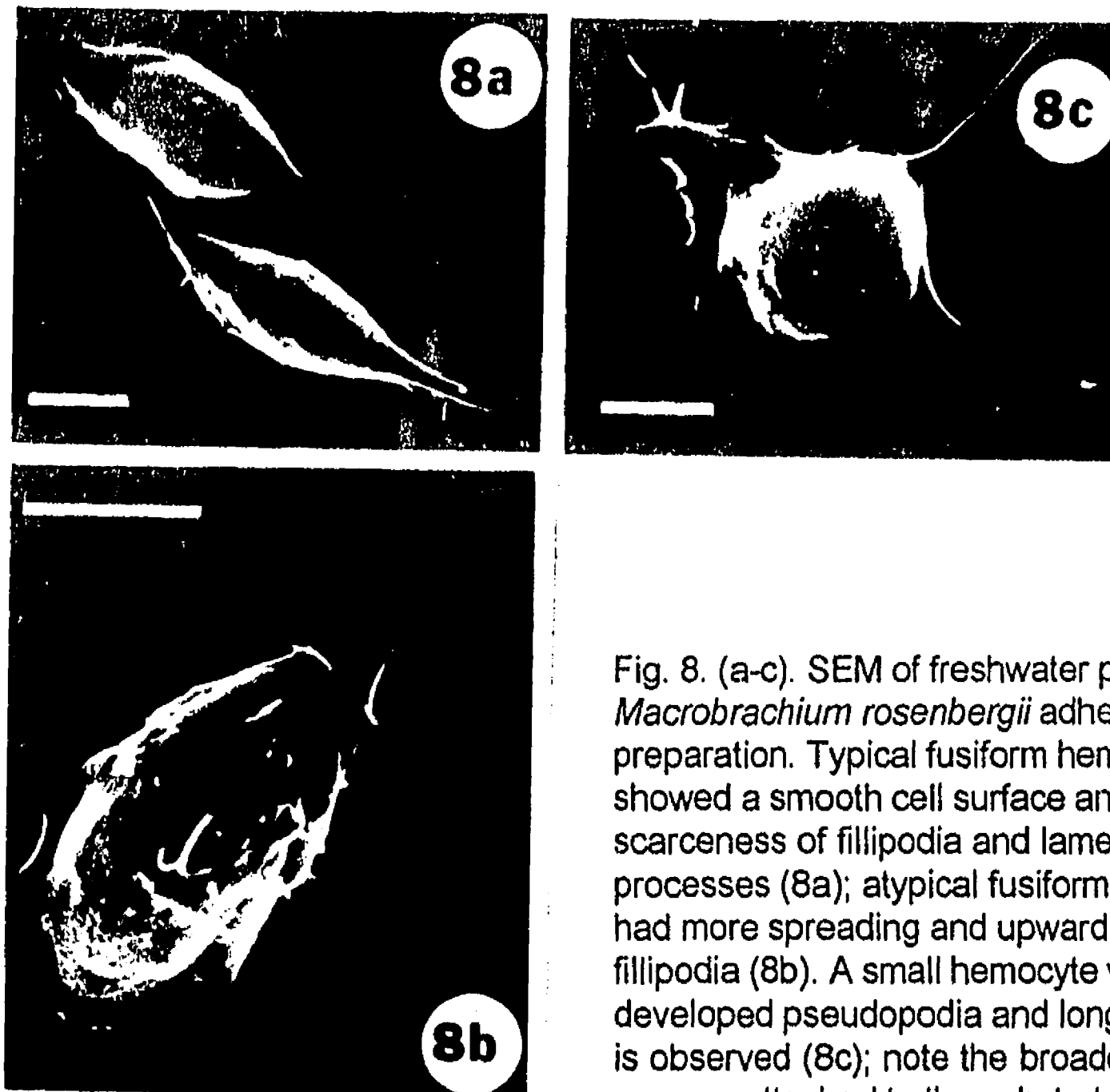


Fig. 8. (a-c). SEM of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* adherent cell preparation. Typical fusiform hemocytes showed a smooth cell surface and scarceness of fillipodia and lamellipodia-like processes (8a); atypical fusiform hemocytes had more spreading and upward directed fillipodia (8b). A small hemocyte with well-developed pseudopodia and long fillipodia is observed (8c); note the broadcytoplasmic process attached to the substratum. Bar= 5 $\mu$ m.

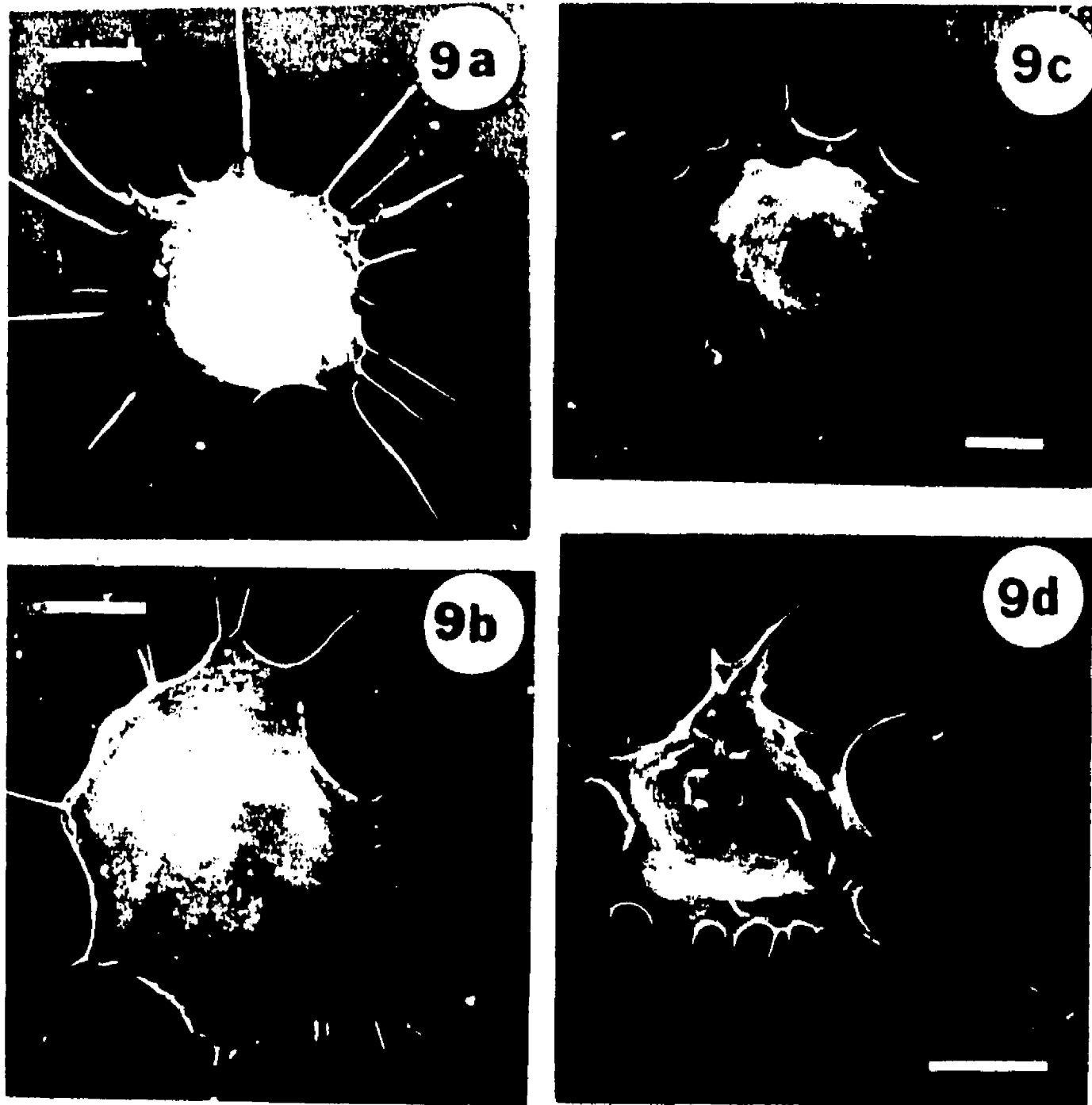


Fig. 9. (a-d). SEM of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* adherent hemocytes. Note, as in Fig. 7, the pleomorphism of large granular hemocytes manifested by the different pattern of filipodia and pseudopodia formation. Compare the morphological correspondence between cells of Fig. 7a-d and cells of Fig. 9a-d, respectively. Bar= 5 $\mu$ m.

**10a****10b****10c****10d****10e****10f**

Fig. 10. (a-f). Nomarski differential-interference-contrast microscopy of phagocytosis assay in freshwater prawn hemolymph adherent cells preparation stained with H-E. Non-phagocytic and phagocytic adherent hemocytes showed well-developed pseudopodia and filipodia. Phagocytic activity was expressed by adherent hemocytes that possess numerous large and rounded cytoplasmic granules (10c,d): others, with small and scarce granules (10 e,f), also internalized chicken red blood cells. 1360X.

## REFERENCES

1. Salt, G. The cellular defence reactions of insects. Cambridge University, London; 1970.
2. Ratcliffe, N.A., White, K.N. Rowley A.F. Walters J.B. 1982. Cellular defence systems of the arthropoda. In: Shöderhäll K., Cell Tissue Res 245:43-49; 1986.
3. Götz, P. Boman, H.G. Insect immunity In: G.A. Kerkut, L.I. Gilbert (eds.). Comprehensive Physiology, biochemistry and pharmacology. Pergamon Press. Oxford pp. 453-485; 1985.
4. Hose, J.H., G.G. Martin and A.S. Gerard. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. Biol. Bull. 178:33-45; 1990.
5. Hose, J.E. and G.G. Martin. Defence functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*. Jour. Inverteb. Pathol. 53:335-346; 1989.
6. Johansson, M.W. and K. Söderhäll. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today. 5(6):171-176; 1989.
7. Rolle, R.S., M.R. Marshall, C.I. Wei and J.S. Chem. Phenoloxidase forms of the florida spiny lobster: Immunological and spectropolarimetric characterization. Comp. Biochem. Physiol. 97B(3):483-489; 1990.
8. Kobayashi M., Johansson M.W. and Söderhall, K. The 76 kDa cell adhesion factor from crayfish haemocyte promotes encapsulation *in vitro*. Cell. Tiss. Res. 260:13-18; 1990.
9. Ratcliffe, N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W. and Rhodes, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances; 1985.
10. Tsing, A., J. M. Arcier and M. Brehélin. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. Jour. Invertebr. Pathol. 53:64-77; 1989.
11. Hose, J.E., G.G. Martin, V.A. Nguyen, J.Lucas and T. Rosenstein Cytochemical features of shrimp hemocytes. Biol. Bull. 173:178-187; 1987.

12. Goldenberg, P.Z., A.H. Greenberg and J.M. Gerrard. Activation of lobster hemocytes: cytoarchitectural aspects. *Jour. Invertebr. Pathol.* 47:143-154; 1986.
13. Peebles, J.B. A Rapid technique for molt staging in live *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture.* 12:173-180; 1977.
14. Söderhäll, K., and V.J. Smith. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev. Comp. Immunol.* 7:229-239; 1983.
15. Van Harrevald, A. A physiological solution for fresh-water crustaceans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 34:428-432; 1936.
16. Reynolds, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17:208-212; 1963.
17. Lanz, H., V. Tsutsumi and H. Arechiga. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. *Devel. Comp. Immunol.* 17:389-397; 1993.
18. Söderhäll, K., Vey, A. and M. Ransted. Haemocytes lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish haemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 8:23-29; 1984.



PARTICIPATION OF THE LECTIN FROM FRESHWATER PRAWN  
*Macrobrachium rosenbergii* HEMOCYTES IN THE RECOGNITION OF NON-  
SELF CELLS.

<sup>1</sup> Lorena VAZQUEZ, <sup>2</sup> Guadalupe MALDONADO, <sup>2</sup> Concepción Agundis, <sup>3</sup> Armando PEREZ, <sup>4</sup> Edwin L. COOPER and <sup>5</sup> Edgar ZENTENO.

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica, Centro de Investigaciones Biológicas Félix Frías, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, 62210, México. <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Tlalpan, D.F. 40085 México. <sup>3</sup> Departamento Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM., 04510 México, <sup>4</sup> Department of Anatomy and Cell Biology, UCLA Medical Center, Los Angeles, California, 90095 USA. <sup>5</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM., 04510 México.

Running title: Hemocyte lectin from *Macrobrachium rosenbergii* circulating hemocytes.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*, hemocyte, phagocytosis, cellular lectin.

Corresponding author:

L.Vázquez. PO Box 70159

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM

04510 México D.F. Fax (5)616.24.19.

Enviado a **Journal of Experimental Zoology**

### ABSTRACT

Phagocytic activity of circulating hemocytes from freshwater prawn is mediated by a small group of granulocytes. The recognition of non-self cells seems to be mediated by two independent mechanisms: specific recognition of O-acetyl sialic acid and of N-acetylated sugar structures on erythrocytes and a non-specific mechanisms. Both mechanisms show differences in their optimal temperature and time for activity. Hemocytes with phagocytic activity show positive interaction with rabbit Immunoglobulin G raised against the serum lectin, suggesting the active participation of a membrane lectin in the recognition of non-self cells.

## INTRODUCTION

Cellular recognition in invertebrates has been attributed to molecular mechanisms based upon protein-carbohydrate interactions at cell surfaces (Gold and Balding, 1975; Smith and Ratcliffe, 1980). Lectins seem to be ubiquitous proteins in the hemolymph of invertebrates and there is substantial evidence that they are synthesized by hemocytes (Renwrantz, 1986), thus, lectins can act as opsonins that can bind directly to surface sugars on foreign cells (e.g. erythrocytes). Since lectins are active participants in cellular and humoral immune recognition mechanisms, several roles have been proposed for them in invertebrates, including participation in cell aggregation, fertilization, embryonic development, wound repair, metamorphosis and transport of complex sugars (Ravindranath and Cooper, 1984; Ravindranath et al., 1985; Renwrantz, 1986; Vasta, 1992). The present work was aimed at identifying the role of carbohydrate-mediated mechanisms in the recognition of non-self structures by the hemocytes of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the possible participation of a specific lectin present on hemocyte membranes.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Adult freshwater prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) were collected in the farms from 'El Jicarero', Morelos State, Mexico, and kept in aerated tanks until use as previously described (Vázquez et al., 1993).

### Purification of serum lectin

Purification of the serum lectin was done by affinity chromatography on a column with fetuin-Sepharose 4 B (Sigma Chemical Co., St Louis Mo, USA) according to the method described previously (Vázquez et al, 1994). Homogeneity of the lectin was also assessed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described elsewhere (Vázquez et al, 1993).

The hemagglutinating activity of the purified serum lectin was tested in the presence of erythrocytes from different animal species by the two-fold serial dilution method; 25  $\mu$ l of the lectin was diluted in Tris-phosphate buffered saline (TBS; 0.01 M Tris, 0.05 M Na phosphate and 0.154 M NaCl, pH 7.4, containing 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) and additioned with 25  $\mu$ l of a solution of 2% ( $2 \times 10^6$ ) erythrocytes in TBS. Agglutination was observed after 1 h. Results are represented as the inverse of the last dilution with agglutinating activity.

### Harvesting hemocytes

Hemolymph was withdrawn aseptically and collected in an anticoagulant solution for crustaceans, according to the method reported by Soderhall and Smith (1983) modifying slightly the pH

(0.45 M NaCl; 0.1 M glucose; 30 mM Na citrate, 26 mM citric acid and 10 mM EDTA, pH 5.8 ). After centrifugation at 300 g for 5 min, the supernatant was removed, hemocytes were washed in sterile Van Harrevald's solution (1963) (SVH, 0.2 M NaCl, 0.05 M KCl, 0.014 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.003 mM MgCl<sub>2</sub> solution, pH 7.4)( Van Harrevald; 1963), finally the cell concentration was adjusted to 2x10<sup>5</sup>/ml with SVH. Cell viability (>90%) was determined by trypan blue dye exclusion.

### **Erythrocytes**

Human erythrocytes from healthy donors were obtained from the Central Blood Bank, IMSS, Mexico, D.F.. Erythrocytes from different animal species were obtained at facilities of the Faculty of Veterinary Medicine, UNAM, Mexico. Erythrocytes were washed several times with TBS, pH 7.4, and centrifuged at 300 g for 5 min before using them in hemagglutinating and phagocytic assays.

### **In vitro phagocytosis**

Hemocyte monolayers were performed as follows: aliquots of 50 µl of the hemocyte suspension were added to wells of flat-bottom culture plates (Falcon Plastics, USA). Hemocytes were incubated for several time intervals (1 to 60 min) and temperature ranges (0 to 40°C) in the presence of erythrocytes at a final concentration of 0.5-1.5x10<sup>6</sup> (ratio of 10:1 erythrocyte/hemocyte). Non-phagocytosed erythrocytes were discarded by washing the monolayer thrice with TBS and once with hypotonic saline solution (0.1 mM NaCl in water) to lyse adhered erythrocytes before staining with Giemsa dye. Hemocyte phagocytosis was observed by Nomarski differential-interference-contrast microscopy, 1360X magnification.

All experiments were done in triplicate with three different field readings, each representing a minimum of 100 hemocytes. Phagocytosis is expressed as the phagocytic index (PI), which represents the percent of hemocytes that phagocytose, at least, one erythrocyte (Maldonado et al, 1994).

Phagocytosis was assayed also in the presence of erythrocytes previously treated with the neuraminidase from *Clostridium perfringens* (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany): 0.5 ml of erythrocytes were incubated for 45 min with 0.1 U of neuraminidase at 37°C; then, cells were washed with TBS and adjusted to the same concentrations as untreated cells before being tested (Vázquez et al., 1993). All assays were performed in triplicate and results are represented as  $\pm$  the standard deviation of the mean.

#### **Effect of *M. rosenbergii* lectin and sugars on the phagocytic activity of hemocytes**

Aliquots of 0.5 ml erythrocytes were incubated at 25°C for 30 min with different lectin concentrations, ranging from 0.001  $\mu$ g (as a subagglutinating dose) to 10.0  $\mu$ g/ml concentration, before performing phagocytic assays. Sugar specificity of the phagocytic activity was tested by incubating the hemocyte monolayer for 10 min with carbohydrates at 100 mM concentration or 10  $\mu$ M glycoproteins (bovine submaxillary gland mucin and human  $\alpha_1$ -glycoprotein acid) in TBS before addition of erythrocytes. These phagocytic assays were performed at 25°C and evaluations were performed after 30 min incubation, as described earlier. The effect of sugars on the phagocytic activity was not modified when the hemocyte monolayers

were washed immediately before addition of erythrocytes in order to eliminate soluble sugars. Desialylation of bovine fetuin and mucine from submaxillary gland was performed by incubating 10 mg of each glycoprotein in 0.02N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> for 1 h at 100°C, as described previously (Vázquez et al., 1994)

#### **Production and labeling of rabbit IgG against serum lectin**

Two month old female New Zealand rabbits were immunized intraperitoneally with 300 µg of *M. rosenbergii* purified lectin in 1 ml of Freund's complete adjuvant, then 100 µg booster injections in 500 µl of Freund's incomplete adjuvant were given intraperitoneally at 2-week intervals for two months; three days before bleeding, rabbits received a final i.v. injection with 100 µg of lectin in incomplete adjuvant. Blood was obtained by cardiac puncture and Immunoglobulin G (IgG's) were purified by fractionation with 50% solid ammonium sulfate and then by ionic exchange chromatography on DEAE-Sephadex as described previously (Vázquez et al, 1994). Purified IgG's were biotin labeled according to the procedure described by Savage et al.(1992). Monospecificity of rabbit antibodies was assessed by immunoelectrophoresis on agarose plates (Vázquez et al., 1994).

### **Effect of antibodies on the phagocytic activity**

Hemocytes were incubated in different dilutions of the specific IgG on the hemocyte monolayer during 15 min at 25°C before adding the erythrocytes. Optimal inhibitory effect for phagocytosis of rat erythrocytes was obtained with a 1:100 dilution of IgG from immunized rabbits. Control experiments were performed with 100 µg/ml of commercial rabbit IgG and IgM (Sigma Fine Chem, St Louis Mo, USA). Phagocytic index was evaluated and reported as described below.

### **Immunocytochemical assays**

Morphological analysis of hemocytes were made with differential interference contrast (Nomarsky) by using an IMT II Olympus microscope. Membrane lectin was detected using biotin-avidin systems with biotin labeled antibodies and positive reactions were identified with avidin-phosphatase, using an alkaline phosphatase staining kit (Sigma Chemical Co., St Louis Mo USA).

### **Protein determination**

Protein concentration of lectin fractions was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard.



## RESULTS

### Hemagglutinating activity of purified serum lectin

The hemagglutinating activity of affinity purified lectin was assessed using erythrocytes of several animal species, including human ABO. The hemagglutinating activity was only observed at concentrations equal or above 2  $\mu\text{g/ml}$  lectin with erythrocytes from rat, rabbit, and 3 day old chickens.

### Phagocytic activity of hemocytes

The phagocytic activity of hemocytes was evaluated by incubating different erythrocytes, including human A,B, and O. Hemocytes showed strong phagocytic activity in the presence of erythrocytes from 3 days old chickens, rat and rabbit; when desialylated erythrocytes were used, this activity diminished (Table 1). No significant increase in the phagocytic activity of hemocytes was observed in the presence of lectin-opsonized erythrocytes from any of the tested species. The main cellular group possessing phagocytic activity is composed of granulocytes, which characteristically possess large granules and comprise 20% of the total circulating hemocyte population.

### Effect of sugars on phagocytic activity

The effect of sugars on phagocytic activity of hemocytes was analyzed in the presence of several mono and oligosaccharides. Depending upon the sugars used, phagocytic activity decreased in the presence of carbohydrates and oligosaccharides containing N-acetyl groups or sialylated glycoproteins. From the monosaccharides tested only N-acetyl-D-glucosamine,

N-acetyl-D-galactosamine, and neuraminic acid showed inhibition of the phagocytic activity on hemocytes at 100 mM concentrations, but only in the presence of rat, rabbit, or 3 days old chickens red blood cells. Sialyllactose or sialylated glycoproteins, such as bovine submaxillary gland mucin and fetuin, showed powerful inhibitory effects in the presence of these erythrocytes (Table 2). In the presence of other erythrocyte types, these sugars did not show any effect, even at 100 mM concentrations for oligosaccharides and monosaccharides or at 10  $\mu$ M in the presence of submaxillary gland mucin (not shown). Other sugars tested, such as D-glucose, D-mannose, D-galactose or L-fucose, at 100 mM concentrations or human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein, ovomucoid, asialofetuin, and asialobovine submaxillary mucin, did not modify the phagocytic activity of the hemocytes in the presence of any type of erythrocytes.

Figures 1 and 2 show that time and temperature play different roles in the phagocytic activity. In the presence of rat or chicken erythrocytes, 50% of the maximal phagocytic index was obtained at 12 min incubation; however 20 min were required to obtain the maximal effect of phagocytosis when human erythrocytes were used (Fig 1). The optimal phagocytic activity is obtained at 24°C with human erythrocytes and 30°C are necessary to obtain the optimal effect for rat or chicken erythrocytes (Fig 2).

IgG's obtained from immunized rabbit against the serum lectin caused 50% decrease in the phagocytic activity of rat, rabbit, and chicken (3 days old) erythrocytes. However, the effect of these antibodies is absent when phagocytosis assays were performed in the presence of erythrocytes from other animal species. Commercial IgG or IgM from rabbits do not exert any effect on the phagocytic activity (not shown).

#### **Immunocytochemical analysis**

Immunocytochemical assays performed on circulating hemocytes indicated that granular cells possess peroxidase activity. A small part of hemocytes, consisting of granular cells, showed positive reaction on membrane surfaces with labeled rabbit IgG produced against serum lectin, as identified by Nomarsky microscopy (Fig 3); these cells represent 20% of the total circulating hemocytes .

## DISCUSSION

Decapod crustaceans are able to eliminate a variety of foreign material, including viruses (McCumber and Clem, 1977) and bacteria (White and Ratcliffe, 1982), and removal is attributed to circulating as well as fixed phagocytes (Mullainadhan et al., 1984; Mullainadhan and Renwarantz, 1986), whose morphology and function is well established (Factor and Beeckman, 1990; Sagrista and Dufort, 1990). Participation of the circulating hemocytes in clearance has been implicated in several *in vitro* and *in vivo* experiments showing phagocytic (Fontaine and Lightner, 1974; Goldenberg et al., 1984) and extensive enzymatic activity (Smith and Soderhall, 1983; Hose et al., 1990). Our results indicate that, in the freshwater prawn *M. rosenbergii*, the phagocytic activity produced by the circulating hemocytes is exerted primarily by granulocytes. We observed that the number of cells which showing phagocytic activity represent a small proportion (20%) of the total hemocytes population.

The interaction pattern shown by the *M. rosenbergii* granulocytes in the presence of erythrocytes from different vertebrate animals (as an example of non-self cells) strongly suggests that phagocytic activity involves a restricted carbohydrate-recognition mechanism. This suggestion is based on their capacity to recognize N-acetylated sugar structures and sialic acid containing cells. Specificity of the putative hemocyte

receptors seems to be directed to sialylated structures and the Q-acetylsialic acids, since phagocytic activity of granulocytes is twice as powerful in the presence of rat, rabbit, and chicken erythrocytes which contain Q-acetylsialic acid on cell surface glycoconjugates, than in the presence of human or pig erythrocytes, which contain only N-acetylneuraminic or glycolyl-neuraminic acid. The potent inhibition of phagocytic activity by bovine submaxillary gland mucin which contain 9(8,7)-Q-acetylsialic acid gives further support to this suggestion. The specificity revealed by phagocytic these patterns is similar to that shown by the serum lectin (Vazquez *et al.*, 1993 and 1994). Opsonizing activity, represented by the increase of phagocytosed erythrocytes in the presence of serum lectin, is almost nonexistent. In preliminary studies we have observed that labeled lectin does not interact with circulating hemocytes.

The granulocytes also recognize foreign cells, in an apparently non-mediated sugar-recognition mechanism. Each mechanism is temperature and time dependent. Participation of, at least, two major mechanisms in the recognition pattern of foreign particles by invertebrate hemocytes has been reported by different authors (Amirante and Guidae-Mazzalai, 1978; Vasta *et al.*, 1984; Goldenberg *et al.*, 1984; Bayne, 1990). One of these mechanisms seems to be achieved directly by means of integral membrane recognition molecules and the other by opsonizing molecules, such as circulating lectins (Bayne, 1990; Vasta 1992, for reviews).

In decapods the most important group of cells that clear foreign particles are the fixed phagocytes. Hemocytes also eliminate particles, but they differ from fixed phagocytes in that they require a mechanism of activation, usually triggered by their adherence to glass (Martin et al., 1993; Goldenberg et al., 1984) or by the participation of humoral factors, as observed in lobsters (Goldenberg et al., 1984).

In our work we establish the presence of a lectin on the surfaces of granular hemocytes. Identification of this membrane lectin was accomplished by positive reaction with labeled IgG raised against the purified serum lectin, indicating the presence of common epitopes. Like serum lectin, the membrane lectin possesses specificity for sugars and for the same erythrocytes. The membrane lectin shows great affinity for N-acetylated and sialic acid containing structures and mainly directed to 9-O-acetyl sialic residues. The hemocytes recognized by these antibodies are granular cells, which represent 20% of the total hemocyte population.

The membrane lectin has been identified in several invertebrates, including some protozoan as *Acanthamoeba* (Brown et al., 1975), plasmodium (Jungery et al., 1983), and in tunicates (Parrinello and Arizza, 1989). A similar lectin to the freshwater prawn system, in the plasma and hemocyte, has been demonstrated in the blue crab *Callinectes sapidus* (Cassels et al., 1986) and in the oyster *Crassostrea virginica* (Vasta et al., 1984). Our results strongly suggest that the membrane lectin could represent a phenotypic cell marker of granular hemocytes showing phagocytic

activity and which seems to participate in the activation of hemocytes.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Our research has been financed, in part, by Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Programs PAPIIT and PADEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, and from the UC-MEXUS Program (E.L. Cooper).

TABLE 1. PHAGOCYtic ACTIVITY OF FRESHWATER PRAWN HEMOCYTES

ERYTHROCYTES	PHAGOCYtic INDEX <sup>1</sup>
HUMAN A,B,O	18 ± 7
RAT	38 ± 8
MOUSE	15 ± 5
RABBIT	23 ± 8
CHICKEN(3 days)	35 ± 6
CHICKEN(asialo) <sup>2</sup>	20 ± 5
HORSE	17 ± 6
PIG	18 ± 5
HUMAN A+ MRlectin <sup>3</sup>	18 ± 7
RAT+ MRlectin <sup>3</sup>	39 ± 4
Human A+IgG against the lectin <sup>4</sup>	17 ± 4
Rat+IgG against the lectin <sup>4</sup>	18 ± 5

<sup>1</sup>Phagocytic index represents the percent of hemocytes with at least one erythrocyte. Experiments were run in triplicate and ±SD (Standard Deviation) of the mean is represented. <sup>2</sup>Desialylated with 0.1 U of *C. perfringens* neuraminidase. <sup>3</sup>Erythrocytes were incubated with 0.2 µg of serum *M. rosenbergii* lectin 15 min before addition to the hemocyte monolayer. <sup>4</sup> Hemocytes were incubated with rabbit IgG raised against the lectin 15 min before adding the erythrocytes. IgG and IgM from non immunized rabbits shows no effect on phagocytic activity of hemocytes.



TABLE 2. EFFECT OF CARBOHYDRATES ON THE PHAGOCYTTIC  
ACTIVITY OF FRESHWATER PRAWN HEMOCYTES

CARBOHYDRATE	CONCENTRATION mM	PHAGOCYTTIC INDEX
Control (without sugar)	100	32 ± 6
GlcNAc	100	27 ± 4
GalNAc	100	28 ± 5
NeuAc	100	23 ± 6
NeuAc α2,3 lactose	20	19 ± 5
NeuAc α2,6 lactose	20	16 ± 5
Bovine gland mucin*	0.02	14 ± 5
Asialo bovine gland mucin*	0.1	26 ± 5
Fetuin	0.02	15 ± 4
Asialofetuin	0.1	34 ± 6

Hemocytes were incubated with the carbohydrates or bovine submaxillary mucin (\*expressed in  $\mu\text{M}$ ), 10 min before the addition of 3 day old chicken erythrocytes. Phagocytic Index represents the percent of hemocytes with, at least, one erythrocyte; experiments were run in triplicate and  $\pm$  SD of the mean is also represented. Neither 100 mM of D-galactose, D-mannose, D-glucose, L-fucose or 0.1  $\mu\text{M}$  of human  $\alpha_1$ -glycoprotein acid nor ovalbumin exerted an important effect on phagocytic activity.

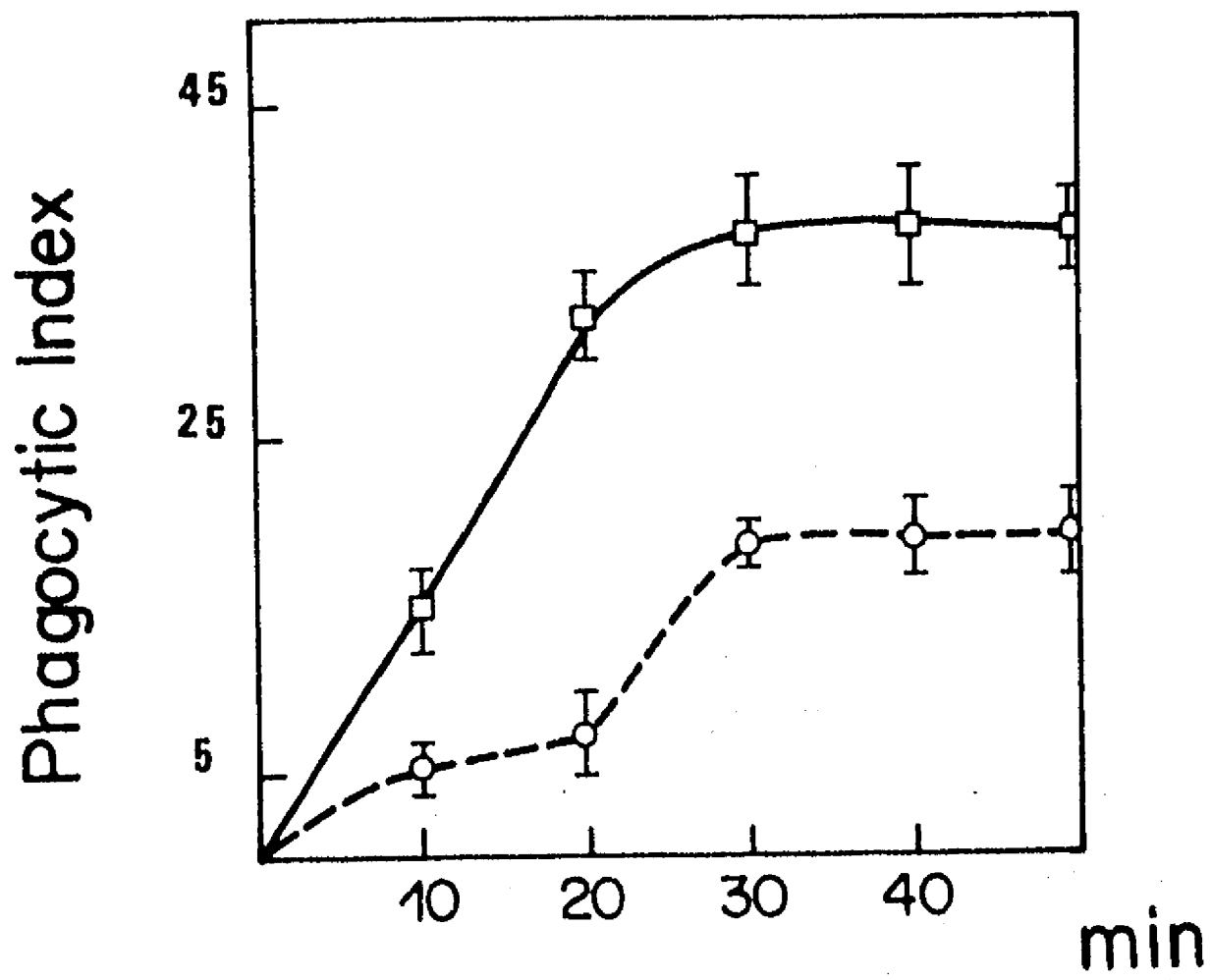


Figure 1. Time dependence of incubation of non-self cells for optimal phagocytic activity of *M. rosenbergii* hemocytes at 24 °C, in the presence of chicken erythrocytes (3 days old) (□-□) and human erythrocytes (O-O).

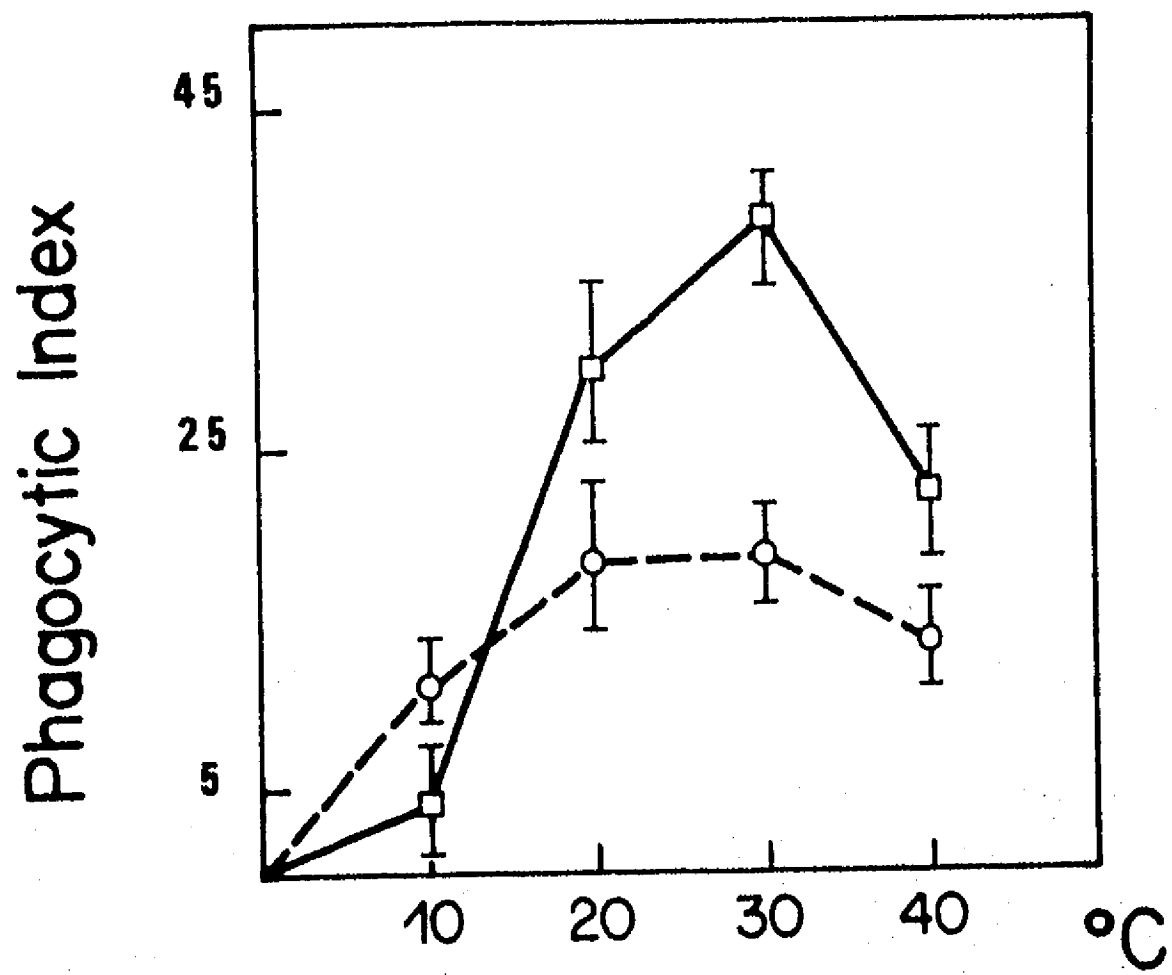


Figure 2. Effect of temperature on phagocytic activity of *M. rosenbergii* hemocytes in the presence of chicken erythrocytes (□-□) and human erythrocytes (O-O).



Figure 3. Freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hemocytes. Nomarski differential-interference-contrast microscopy of a suspended cell preparation, recognized by biotin labeled rabbit antibodies raised against the *M. rosenbergii* serum lectin. Positive reaction (+). X1360.

#### REFERENCES

- Amirante GA and Mazzalai FG (1978) Synthesis and localization of hemagglutinin in hemocytes of the cockroach *Laucophaea maderae*, L. *Dev Comp Immunol* 2:735-740
- Bayne CJ (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Phagocytosis appears to be an ancient line of defense. *Bioscience* 40, 723-731.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.
- Brown RC, Bass H and Coombs JP (1975) Carbohydrate binding proteins involved in phagocytosis by *Acanthamoeba*. *Nature* 254 (London) 434-435.
- Cassels FJ, Marchalonis JJ and Vasta GR (1986) Heterogeneous humoral and hemocyte associated lectins with N-acyl amino sugar specificities from the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun *Comp Biochem Physiol* 85B, 23-28.
- Factor JR and Beeckman J (1990) The digestive system of the lobster, *Homarus americanus*. III. Removal of foreign particles from the blood by fixed phagocytes of the digestive gland. *J. Morphol.* 206, 293-302.
- Fontaine CT and Lightner DV (1974) Observations on the phagocytosis and elimination of carmine particles injected into abdominal musculature of the white shrimp *Penaeus setiferus*. *J. Invert. Pathol.* 24, 141-148.
- Gold ER and Balding P (1975) *Receptor-specific Proteins*. Elsevier New York.
- Goldenberg PZ, Huebner E and Greenberg AH (1984) Activation of lobster hemocytes for phagocytosis *J. Invert. Pathol.* 43, 77-88.
- Hose JE, Martin GG and Gerard AS (1990) A decapode hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry and function. *Biol. Bull.* 178, 33-45.
- Jungery M, Boyle D, Patel T, Pasvol G and Weatherall DJ (1983) Lectin like polypeptides of *Plasmodium falciparum* bind to red cell sialoglycoproteins. *Nature* 301, 704.
- Maldonado G, Porras F, Fernández L, Vázquez L and Zenteno E (1994) Effect of lectins on phagocytic activity of murine peritoneal macrophages *Immunol. Inv.* 23, 429-436.

-Martin GG, Poole D, Poole C, Hose JE, Arias M, Reynolds L, McKell N and Whang A, (1993) Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. J. Inv. Pathol. 62, 35-39

-Mc Cumber LJ and Clem LW, (1977) Recognition of viruses and xenogeneic proteins by the blue crab, *Callinectes sapidus*. I. Clearance and organ concentration. Dev. Comp. Immunol. 1, 5-14

-Mullainadhan P, Ravindranath HH, Wright RK and Cooper E.L., (1984) Crustacean defense strategies. I. Molecular weight dependence clearance of dyes of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) (Portunidae: Brachyura). Dev. Comp. Physiol. 8, 41-50

-Mullainadhan P. and Renwranz I (1986) Lectin dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel *Mytilus edulis* Immunobiology 171, 263-273.

-Parrinello N and Arizza V (1989) Sugar specific cellular lectins of *Phallusia mamillata* hemocytes: purification, characterization and evidence for cell surface localization. Dev. Comp. Immunol. 13, 113-122

-Ravindranath M H and Cooper E L (1984) Crab lectins: Receptor specificity and biomedical implications. In: Recognition Proteins, Receptors and Probes: Invertebrates. E. Cohen (Ed). Alan Liss N. York pp 83-96

-Ravindranath MH, Higa HH, Cooper EL and Paulson JC (1985) Purification and characterization of an  $\alpha$ -acetylsialic acid-specific lectin from a marine crab *Cancer antennarius*. J Biol Chem 260, 8850-8856

-Renwranz L (1986) Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. Symp. Zool. Soc. Lond. 58, 81-93.

-Sagrsta E and Dufort M (1990) Ultrastructural study of hemocytes and phagocytes associated with hemolymphatic vessels in the hepatopancreas of *Palaemonetes zariquieyi* (Crustacea, Decapoda). J. Morphol. 206, 173-180.

-Savage D, Mattson G, Desai S, Nielander G, Morgensen S and Conklin E. Eds (1992) Avidin-Biotin-Chemistry: A handbook. Pierce Chem Co.

- Soderhall K and Smith V. (1983) Separation of the hemocyte populations of *Carcinus maenas* and other murine decapods and prophenaloxidase distribution. Devl. Comp. Immunol. 7, 229-239.

-Smith VE and Ratcliffe NA (1980) Cellular defense reactions of the shore crab *Carcinus maenas*(L.): In vivo hemocytic and histopathological responses to injected bacteria. J.Invert.Pathol. 35, 65-74.

-Smith VE and Soderhall K (1983)  $\beta$ 1,3 glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull., 164, 299-314

-Van Harreveld A (1963) A physiological solution for freshwater crustaceans. Proc. Soc. Exp.Biol.Med. 34, 428-432.

-Vasta GR (1992) Invertebrate lectins: Distribution, Synthesis, Molecular Biology, and Function. Glycoconjugates. Composition, Structure and Function. Allen HJ and Kisailus EC eds., Marcel Dekker, N York, 593-634.

-Vasta GR, Cheng TC and Marchalonis JJ (1984) A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*) Cel. Immunol. 88, 475-485.

-Vazquez L, Masso F, Rosas P, Montaña L and Zenteno E (1993) Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (crustacea decapoda) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 105B, 617-623

-Vázquez L, Lanz H, Montaña L, Vázquez L and Zenteno E(1994) Biological activity of the lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. Lectins Biol. Biochem. Clin. Biochem. Vol 10, E.Van Driessche, S Beeckmans, T.C. Bog-Hansen, eds. Textop, Denmark pp 261-265.

-White K N and Ratcliffe N A (1982) The segregation and elimination of radio and fluorescent-labelled marine bacteria from the haemolymph of the shore crab, *Carcinus maenas*. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 65, 857-870.



## Bacterial Agglutination by the Sialic Acid Specific Serum Lectin From *Macrobrachium rosenbergii*

Lorena Vazquez,\* Laura Jaramillo,† Ricardo Lascuirain,‡ Edwin L. Cooper,‡  
 Patricia Rosast and Edgar Zenteno,\*§

\*LABORATORIO DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, CIB-FELIX FRIAS, UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS, CUERNAVACA MORELOS, 62210 MEXICO; †DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, TLALPAN 4085 MEXICO D.F., 01025 MEXICO; ‡DEPARTMENT OF ANATOMY-ANEP-CENT-BIOLOGY, UCLA SCHOOL OF MEDICINE, LOS ANGELES, CA., 90024-1763, U.S.A.; AND §LABORATORIO DE INMUNOLOGIA, DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM, MEXICO D.F., 04510 MEXICO

**ABSTRACT.** We have isolated a serum lectin from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* that agglutinates *Bacillus cereus* and *Aeromonas* sp. This lectin also agglutinates other bacteria such as *Pasteurella haemolytica* biotype A (capsular serotype 12), several serotypes from *P. multocida* and *Staphylococcus aureus* and to a lesser extent *Escherichia coli* and *Salmonella arizonae*. Lectin recognition of well known polysaccharide components seems to involve several bacterial O-keto and O-methyl containing sugars, the N-acetyl-sugar residues and teichoic from the polysaccharide cell wall. COMP BIOCHEM PHYSIOL 113B:0:000-000, 1996.

**KEY WORDS.** *Macrobrachium rosenbergii*, sialic acid specific lectin, glycoproteins, bacterial polysaccharides

### INTRODUCTION

Lectins precipitate soluble glycoconjugates and bind to carbohydrate determinant moieties of membrane glycoproteins and glycolipids thus inducing agglutination of the various cell types (Barkai-Golan and Sharon, 1978; Goldstein and Hayes, 1978; Liener *et al.*, 1986; Kilpatrick *et al.*, 1991; Parrinello, 1991). Consequently, lectins are molecules that play a role in immunological defense systems since they can sequester viruses, bacteria, other cellular-microinvaders, as well as substances that they secrete (Yeaton, 1981). Opsonization that occurs when a lectin binds bacteria to invertebrate blood cell (hemocyte) surfaces is considered to be the first step that promotes adherence, ingestion and subsequent elimination of microbes (Martin *et al.*, 1993). Analyses of microbial agglutination in invertebrates has consistently employed experimental procedures resulting in less information concerning isolation, identification and functional analysis of lectins under natural conditions.

Considering their specificity for carbohydrate-containing structures, most analyses have characterized structural components of bacteria by using lectins that possess specificity for neutral sugars. Only a few investigations, however, have been reported that reveal sialic lectins derived from invertebrates (Ravindranath and Cooper, 1984; Ravindranath *et al.*, 1985; Vasta, 1992; Doyle, 1994). This dearth of information is prob-

ably a consequence of the nonexistence of few reported examples of bacteria that possess this sugar residue (Shauer, 1982; Kenne and Linberg, 1983). This restrictive characteristic complicates explanations of the role(s) of invertebrate derived, sialic acid specific lectins that effect opsonization. We have recently discovered a lectin from the economically important freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, that agglutinates bacteria involving several bacterial determinants: O-keto and O-methyl containing sugars, the N-acetyl-sugar residues and teichoic acid, components of the polysaccharide cell wall.

### MATERIAL AND METHODS

#### Collection of Prawns

double  
spec.

Adult freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* were collected in El Jicarero ponds, in the state of Morelos, Mexico.

#### Lectin Purification

Hemolymph was obtained from *M. rosenbergii* by inserting a 21-gauge needle into the pericardial sinus. The serum was dialyzed against 0.5 mM Tris-HCL (pH 7.4)/0.15 M NaCl/3 mM CaCl<sub>2</sub> (TBS, Tris-buffered saline) and stored at -20°C until use. The lectin was purified in Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chem, Uppsala, Sweden) column (1.5 × 50 cm) containing rat erythrocyte stroma (Vazquez *et al.*, 1993), purified lectin was obtained with 3% acetic acid in water (v/v). Affinity purified lectin fractions were dialyzed against distilled water, lyophilized and kept at -70°C until use.

Tel: (5) 623.21.69



### Analytical Assays

Protein determination was performed according to the method of Lowry, using bovine serum albumin as the standard (Lowry et al., 1951).

### Bacterial Isolation

The opportunistic bacterial cells from prawns were obtained from the cuticular surfaces of abdominal and uropod lesions. Bacteria from *M. rosenbergii* were isolated in Tryptic Soy Agar (BBL Cockeysville, U.S.A.), grown up in a blood-agar medium and incubated at 25–30°C for 24 hr. Identification of the species was performed by biochemical characterization according to previously described methods (Koneman et al., 1983). Other bacteria were also used: *Pasteurella*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. They were obtained from the Bacterial Reference Laboratory, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mexico.

### Agglutination Assays

The bacteria were transferred to Mac Conkey agar for 48 hr in order to eliminate the blood-agar remnants. After washing three times and centrifugation at 3000 rpm for 15 min in sterile phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M sodium phosphate, 0.14 M sodium chloride pH 7.2) bacteria were fixed in formaldehyde 0.4%. Excess of formaldehyde was eliminated by washing with PBS and different species of bacteria were adjusted to an optical density of 0.15 at 540 nm in PBS complemented with 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Agglutinating activity of serum and the affinity purified lectin were performed using two fold dilutions in PBS, in flat microtiter plates (NUNC, Denmark). Inhibition of bacterial agglutination was tested by incubating the lectin for 30 min in the presence of 100 mM of neuraminic acid (*N*-acetyl-*D*-neuraminic acid) or 0.2 μM of bovine submaxillary gland mucin (Sigma Fine Chem. St Louis, Mo. U.S.A.) or stromal rat glycopeptides from rat erythrocytes prior to adding the lectin to suspensions of bacteria. Analyses were performed in triplicate in the presence of 100 mM mannose and glucose as noninhibitory controls. Results were determined by comparing bacterial agglutinating titers of the lectin as described previously (Vazquez et al., 1993).

### Conjugation of Rhodamine Isothiocyanate to *M. rosenbergii* Lectin

Conjugation of rhodamine B isothiocyanate (RITC, SIGMA Chem. Co., St Louis, Mo., U.S.A.) with the lectin was performed according to methods used by The and Feltkamp (1970). Pure crystalline RITC (10 μg) previously dissolved in 100 μL dimethyl sulfoxide was added to 1 mg of purified lectin in 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.5), at a ratio of 10 μg of RITC/1 mg of purified lectin. This mixture was then incubated 120 min at room temperature, and excess dye was eliminated by exhaustive dialysis against PBS. Bacteria were fixed

on slides by absolute alcohol for 5 min and treated with 0.2% bovine serum albumin (BSA) in PBS prior to incubating them for 30 min at 20 ± 2°C in the presence of lectin-RITC. Excess labeled-lectin was eliminated by washing with PBS-0.003% Triton X-100 to which was finally PBS-glycerine (1:1 v/v). Any positive labeled-lectin that recognized bacteria was observed using a microscope MIT II/Olympus (Japan) equipped with an IV/2 epifluorescence condenser.

## RESULTS

### Recognition of Bacterial Species by *M. rosenbergii* Serum Lectin

In apparently normal adult *Macrobrachium rosenbergii* we found some organisms which show well defined superficial cuticular dark lesions in different proportions. We isolated two different types of bacteria from these cuticular lesions: *Aeromonas* sp and *Bacillus cereus*. Agglutination assays, using total serum or the purified lectin, revealed that agglutination is powerful in the presence of *Aeromonas* sp at lectin concentrations of 0.1 μg/ml for each 2 × 10<sup>5</sup> cells. As shown in Table 1, agglutinating activity against other bacterial strains were also observed. From *Pasteurella haemolytica*, only biotype A (capsular serotype 12) and *P. multocida* (capsular serotype 9) were agglutinated. Bacteria that possessed other capsular serotypes were not recognized by the lectin at concentrations as high as 25 μg/ml. *Escherichia coli*, *Salmonella arizona* and *Staphylococcus aureus* (coagulase positive) were also agglutinated by high concentrations of lectin. In this instance, agglutinating activity was always inhibited by adding 100 mM of neuraminic acid, 0.2 μM of bovine gland submaxillary mucin or glycopeptides from rat erythrocytes (containing sialic acid, mannose, galactose, *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *N*-acetyl-*D*-galactosamine

TABLE 1. Bacterial agglutination by *Macrobrachium rosenbergii* lectin

Bacterial strain	μg Lectin	Fluorescence
<i>Aeromonas</i> sp	0.1	++
<i>Bacillus cereus</i>	1.0	+
<i>Pasteurella haemolytica</i> Biotype A capsular serotype 12	2.5	+
<i>Pasteurella multocida</i> capsular serotype 9	5.0	+
<i>Salmonella aureus</i>	5.0	+
<i>Salmonella arizona</i>	10.0	±
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positive	5.0	+
<i>Escherichia coli</i>	10.0	±

Relative fluorescence intensity was observed on a microscope equipped with an IV/2 epifluorescence condenser and expressed as (++) high, (+) medium or (±) low. No visible agglutination nor fluorescence intensity was observed at concentration of 50 μg/ml of lectin in the presence of bacterial strains *P. haemolytica* Biotype A capsular serotypes 5 and 6, Biotype T capsular serotypes 3 and 4 and *P. multocida* capsular serotypes 10 and 13. Agglutination induced by the lectin was inhibited with 100 μM NeuAc; 0.2 μM bovine submaxillary gland mucin or rat stroma.

TABLE 2. Effect of monosaccharides, glycosides and glycoproteins on the bacterial agglutination of *Macrobrachium rosenbergii* lectin

Compound	Concentration (mM)	Relative inhibitory potency
GlcNAc	100	1
GalNAc	100	1
NeuAc	100	1
Muramic acid	100	1
Colominic acid	10*	1
3-O-methyl-glucose	100	1
3-O-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranose	50	2
$\alpha$ -methyl-glucopyranose	50	2
$\beta$ -methyl-glucopyranose	100	1
Rat stroma glycopeptides	0.2**	5000
Bovine submaxillary mucin	0.2**	5000

Minimal concentration required to inhibit the agglutinating activity in the presence of *Pasteurella haemolytica* biotype A capsular serotype 12. \*Molecular weight is not known, concentration reported is expressed in mg/ml. \*\*Values expressed as  $\mu$ M. Other structures with not inhibitory effect at 100 mM concentrations included: D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-tucose, D-glucosamine and N-methyl-glucamine. Asialo bovine submaxillary mucin,  $\alpha$ -glycoprotein acid and ovomucoid were not inhibitors at 100  $\mu$ M.

in 1.5:3:2:2:3 ratios), and by 1 mM of the glycosides: 3-O-methyl-glucose and 3-O-acetyl-D-glucopyranose (Table 2).

#### Presence of the Lectin Revealed by Fluorescence

Specific interaction of *M. rosenbergii* lectin with agglutinated bacteria was assessed by labeling it with rhodamine followed by observations using direct fluorescence microscopy. Interaction between bacteria and RITC-*M. rosenbergii* lectin revealed a homogeneous distribution of putative receptors on the bacterial cell wall (Fig. 1). Control experiments were also per-

formed without lectin in order to indicate no quenching nor intrinsic fluorescence, expressed as ++, + or  $\pm$  fluorescence intensity (Table 1 and Fig. 1). According to our results *Aeromonas* sp showed the highest titer of agglutination whereas *E. coli*, was the least agglutinated.

#### DISCUSSION

The freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, possesses a humoral lectin that agglutinates only rabbit and rat erythrocytes and is a homodimer of 19 kDa (Vazquez *et al.*, 1993). Agglutinating activity is inhibited by adding N-acetylated sugars, sialic acid and sialylated glycoproteins (Vazquez *et al.*, 1991). The O-acetyl group from O-acetyl-sialic acid derivatives present in the bovine submaxillary gland mucin (rich in 9,8,7-O-acetyl sialic acid) is the main group that the lectin recognizes (Vazquez *et al.*, 1993).

Induced bacterial or foreign particle-recognition by the humoral lectins during opsonization, before their ingestion by hemocytes, seems to be an essential process accompanying specific response in crustacean/arthropods and in a general mechanism for all invertebrates (Cooper, 1985; Renwarantz, 1986; Soderhall *et al.*, 1986). Opsonization, a crucial event in immunodefense, has been demonstrated in classical experiments aimed at identifying bacteria or cells that have been previously inoculated into invertebrates (Renwarantz *et al.*, 1981). The nature of the interaction of invertebrate lectins with bacteria is still controversial, although certain experimental approaches have been reported for the LPS-specific binding group of animal lectins (Vargas Albores *et al.*, 1993; Kopacek *et al.*, 1993). Only a few examples of results have revealed a more precise mechanism of interaction with bacteria such as the lectin isolated from the horseshoe crab, *Carciniscorpius rotunda caudia*. In fact, it recognizes the 2-keto-3-

FIG. 1. Photomicrograph (880 $\times$ ) of RITC-*Macrobrachium rosenbergii* lectin that positively recognized *Aeromonas* sp.



deoxyoctonate group in the cell wall polysaccharides of *E. coli* (Dorai et al., 1982).

The interaction of lectins with microorganisms have been useful as well in the typing of fungi, protozoa and for characterizing bacterial cell components (Dwyer, 1974; Hart, 1980; Shlikin and Doyle, 1990). Wheat germ agglutinin, v. gr., has been employed in demonstrating its capacity to interact with *P. haemolytica* biotype T and capsular serotype 3, 4 and 10, due to the presence of N-acetylated residues or their oligomers as cell wall determinants (Craft et al., 1987). In our assays, *M. rosenbergii* lectin recognized only the biotype A, capsular serotype 12 of the same bacterial type. This recognition is probably due to the presence of high amounts of O-acetylated and O-methylated terminal sugar residues (Craft et al., 1987; Kenne and Lindberg, 1983). These same characteristics seem to be present in some types of *P. multocida* which have also been recognized by the lectin *M. rosenbergii*. We found the strongest affinity of *M. rosenbergii* lectin with *Aeromonas* and *Bacillus cereus*.

Turning from invertebrates to fish, *Aeromonas* spp has been frequently associated with ulcerative disease (Kirov, 1993) that may be due to contamination derived from fish that have been cultured in the same pond. In contrast, until now, no clinical lesions have been demonstrated in freshwater prawns. *Bacillus cereus* that possesses structural 2- and 3-O-methylated pentoses (Fox et al., 1993) has also been shown to be agglutinated by the lectin, thus suggesting that *M. rosenbergii* lectin interacts with the O-keto and also the O-methyl residues of bacterial cell walls derived from these opportunistic organisms. *Staphylococci* were also agglutinated efficiently by prawn lectin, probably by a similar mechanism. The teichoic acid from these bacteria is characterized as having  $\alpha$  and  $\beta$  anomers of N-acetyl-D-glucosamine. The coagulase-positive strains of *Staphylococcus* have been found to be agglutinated by the lectin from *Limulus polyphemus* which exerts binding specificity for  $\alpha$  and  $\beta$  anomers of neuraminic acid (Davidson et al., 1982).

*E. coli* and *Salmonella arizonae* were also recognized, by *M. rosenbergii* lectin but with less affinity suggesting that the interacting mechanism of this lectin with bacteria is closely related to that of *Carcinoscorpius rotundicauda*. The sugar specificity characteristic of most invertebrate lectins seems to be highly specific. For that reason, bacterial recognition by those lectins may be not a universal process nor is it a highly specific characteristic of those organisms, as our results suggest.

More work is in progress aimed at determining the biological significance of the bacterial recognition by the freshwater prawn lectin. First, it is essential to classify the hemocytes responsible for synthesis and secretion of lectin and to identify their effector functions such as phagocytosis (Vazquez et al., in preparation). Taking this route will yield characteristics of the lectin/agglutinin that may reveal other fundamental, functional traits that will open new areas of research. For example, opsonins, have been recently shown to display activities, equally akin to functional equivalents of cytokines, par-

ticularly IL-1 (Kelly et al., 1992, 1993a,b). Finally, the results will represent an additional, excellent model that will facilitate the phenotypic characterization of certain bacteria, especially in a species that is of economic importance as a source of food.

This work is dedicated to the generosity of persons at El Jicarero Aquaculture Farm. Our research has been financed, in part, by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (M9201/DXXX6 and XX9), DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México and from the UC-MEXUS program (E. L. Cooper).

## References

- Barkai-Golan, R.; Sharon, N. Lectins as a tool for the study of yeast cell walls. *Exp. Mycol.* 2:110-113;1978.
- Cooper, E. L. Overview of humoral factors in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 9:577-583;1985.
- Craft, D. L.; Chengappa, M. M.; Carter, G. R. Differentiation of *Pasteurella haemolytica* biotypes A and T with lectins. *Vet. Rec.* 12:393;1987.
- Davidson, S. K.; Keller, K. F.; Doyle, R. J. Differentiation of coagulase positive and coagulase-negative staphylococci by lectins and plant agglutinins. *J. Clin. Microbiol.* 15:547-553;1982.
- Dorai, D. T.; Srimal, S.; Mohan, S.; Bachhawat, B. T.; Balganes, T. S. Recognition of 2-keto-3-deoxyoctonate in bacterial cells and lipopolysaccharides by the sialic acid binding lectin from horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicauda*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104:141-147;1982.
- Doyle, R. J. Introduction to lectins and their interactions with microorganisms. *Lectin-microorganism interactions*. (Edited by Doyle, R. J.; Shlikin, M. 1994: pp. 1-65. Marcel Dekker, New York.
- Dwyer, D. M. Lectin binding saccharides of a parasitic protozoan. *Science* 184:471-473;1974.
- Fox, A.; Black, G. E.; Fox, K.; Rostovtseva, S. Determination of carbohydrate profiles of *Bacillus cereus* including identification of O-methylpentoses by using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 31:887-894;1993.
- Goldstein, I. J.; Hayes, C. E. The lectins carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Carbohydr. Chem. Biochem.* 35:127-340;1978.
- Hart, D. A. Lectins in biological systems: applications to microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:197-218;1980.
- Kelly, K. L.; Cooper, E. L.; Raftos, D. A. Purification and characterization of a humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B:749-753;1992.
- Kelly, K. L.; Cooper, E. L.; Raftos, D. A. A humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. *Dev. Comp. Immunol.* 17:29-39;1993a.
- Kelly, K. L.; Cooper, E. L.; Raftos, D. A. Cytokine-like activities of a humoral opsonin from the solitary urochordate *Styela clava*. *Zool. Sci.* 10:57-64;1993b.
- Kenne, L.; Lindberg, B. Bacterial polysaccharides. In: *The Polysaccharides* (Edited by G. O. Aspinall), Vol. 2. 1983: pp. 287-363. Academic Press, San Diego.
- Kilpatrick, D. C.; Van Driessche, E.; Poog-Hansen, T. C. *Lectin Reviews*, Vol. 1. 1991: pp. 28. Sigma Chemical Co., St. Louis, MO 63178.
- Kirov, S. M. Adhesion and piliation of *Aeromonas* spp. *Med. Microbiol. Lett.* 2:274-280;1993.
- Koneman, E. W.; Allen, S. D.; Dowell, V. R.; Sommers, H. M. (Editors) *Diagnostico Microbiologico* 1983: pp. 13-45. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina.

Publ. City OK?

35:127-340;1978

Citi P.B. C. 1978  
in Ref. 1

Same  
etc