

00341

7  
29.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL E INMUNOCITOQUIMICO DE  
LOS HEMOCITOS DEL LANGOSTINO *Macrobrachium rosenbergii*  
(De Man).

TRABAJO

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA  
EN MICROSCOPIA ELECTRONICA APLICADA A LAS CIENCIAS  
BIOLOGICAS

P R E S E N T A

BIOL. CLAUDIA SIERRA CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

257613 1998



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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Lectinas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y el Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría de la Dra. Lorena Vázquez Navarrete y el Dr. Edgar Zenteno Galindo. El proyecto fue financiado por el programa PAPIIT (210494)-UNAM y CONACYT (26068-N).

Agradezco especialmente el apoyo brindado por los Doctores Olga Margarita Echeverría Martínez y Gerardo Hebert Vázquez Nin del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias UNAM, por sus valiosos consejos y asesoría en las técnicas de Microscopía Electrónica.

Un agradecimiento especial a una gran persona y amigo que merece toda mi admiración y respeto, quien siempre ha confiado y ha apoyado mi desarrollo profesional, esperando no haberlo defraudado por la oportunidad que me brindó de trabajar en investigación.

**GRACIAS**

**DR. EDGAR ZENTENO GALINDO.**

## DEDICATORIAS

A MI MAYOR TESORO, MI HIJO: Gabriel Rufs Sierra que es lo mas bello que me ha dado la vida y por quien he realizado el esfuerzo para hacer posible este trabajo, esperando que comprenda que el tiempo que no estuve con el ha sido para labrar su futuro.

A UN SER MUY ESPECIAL, MI MADRE: Ma. Guadalupe Agueda Castillo de Sierra porque gracias a su ejemplo, cariño, apoyo, ayuda y comprensión he podido lograr todas las metas en mi vida y porque siempre ha estado a mi lado.

A UN GRAN SEÑOR, MI PADRE (qepd): Luis Manuel Sierra Navarro que junto con mi madre con su ejemplo, su trabajo y rectitud nos enseñaron a ser lo que ahora somos y a lograr lo que hemos logrado.

A MI ESPOSO: Antoine Rufs Calderón: Por su apoyo, comprensión y compañía.

A MI FAMILIA: mis hermanos: Ague, Adri, Alex y Martha, Blanca y sus familias. A mis sobrinos Ari, Luis, Cristian, Yuri y Andrea. A mi abuelita Lucita y mis abuelitos (qepd), a mis tíos y primos.

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Lorena Vázquez Navarrete por su asesoría, su apoyo y acertados consejos en la realización de este proyecto.
- A la Dra. Ma. Concepción Agundis, por la participación en este proyecto, ya que con los anticuerpos contra la lectina del langostino *M. rosenbergii* que nos proporciono se llevó a cabo la inmunolocalización de la lectina en los hemocitos. Además por ser una excelente persona y amiga.  
Al futuro Químico Industrial Alejandro Rogers Sakuma, por su importante participación en la impresión de este trabajo y por demostrar ser un verdadero amigo y compañero.
- A mis profesores de la Especialidad: Dra. Guadalupe T. Zavala, Dr. Luis Felipe Jiménez, Biol. Ernestina Flores y el Biol. Marco A. González. A quienes agradezco el compartir sus conocimientos conmigo, su apoyo, disposición y amistad.
- Al laboratorio de microscopía electrónica, Facultad de Ciencias UNAM, al laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina UNAM y al laboratorio de lectinas de la UAEM. Por su importante apoyo en este trabajo.
- A mis grandes amigos: Bertha, Sr. Ismael, Fam. López Pérez., Sol, Evelia porque siempre me han brindado su amistad y apoyo.
- A todos mis amigos, compañeros de trabajo y a todos aquellos que han tenido que ver en mi formación profesional y académica como el Dr. J. Felix Frías Sánchez y el Biol. Salvador Santillan.
- Al Dr. Jaime Escalante García por su apoyo incondicional y sus consejos en los momentos mas oportunos

## CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	
II.1 Mecanismos de defensa en los invertebrados.	3
II.2 Importancia del langostino <i>Macrobrachium rosenbergii</i> .	7
II.3 Conceptos básicos de la inmunocitoquímica.	8
III. ANTECEDENTES.	i7
IV. OBJETIVO Y METAS.	24
V. MATERIAL Y METODOS.	
V.1 Obtención de organismos.	25
V.2 Ultraestructura de los hemocitos.	25
V.3 Inmunocitoquímica para la determinación de la presencia de la lectina en los hemocitos.	31
VI. RESULTADOS.	
VI.1 Ultraestructura. Morfología de los hemocitos.	38
VI.2 Inmunocitoquímica. Identificación de la lectina en los hemocitos.	47
VII. DISCUSION.	62
VIII. CONCLUSIONES.	67
IX. APENDICE. Preparación de soluciones.	68
X. LITERATURA CITADA.	70



## I RESUMEN

Los hemocitos circulantes en los crustáceos pueden participar como mediadores de la defensa contra microorganismos patógenos. Esta hipótesis se basa en que la regulación de la resistencia a infecciones la desarrollan las lectinas asociadas a estos grupos celulares, por lo que analizamos la relación de la lectina sérica con las poblaciones celulares de la hemolinfa del langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Esta especie posee una lectina que reconoce específicamente azúcares O-acetilados y O-metilados de la pared de algunas bacterias. Con Microscopia Electrónica y utilizando anticuerpos contra esta lectina se realizaron estudios de inmunolocalización en las células circulantes del langostino y por estudios de ultraestructura se clasificaron las células de acuerdo a su morfología.

Para el análisis de la ultraestructura, la fijación del botón celular se llevó a cabo con glutaraldehído al 1.5%, la postfijación con tetraóxido de osmio, y la deshidratación con etanol (en concentraciones graduales) y óxido de propileno. Se incluyó en la resina epon (glicidéter). El contraste se realizó con acetato de uranilo y citrato de plomo. Nuestros resultados indican que el langostino posee tres tipos de hemocitos: los pequeños ovoides, los fusiformes (que son los más abundantes) y los hemocitos grandes ovoides. Para los estudios de inmunocitoquímica el botón celular se fijó con una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.25%, se deshidrató con alcoholes (en concentraciones graduales) y la inclusión se realizó en resina LR White. La localización de la lectina se llevó a cabo mediante dos ensayos: A) con anticuerpos monoclonales y policlonales anti-lectina sin biotina y

anticuerpos policlonales anti-IgG (como anticuerpos secundarios) marcados con oro coloidal; B) anticuerpos monoclonales y policlonales marcados con biotina y el complejo estreptavidina-oro coloidal para su localización, contrastando con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se detectó la presencia de la lectina en los tres tipos de hemocitos, principalmente en membrana celular y gránulos citoplásmicos sobre todo en los hemocitos grandes y en los fusiformes. Estos datos sugieren que en las células pueden existir mecanismos para regular la concentración de la lectina sérica, liberando probablemente la lectina presente en los gránulos, ante la presencia de microorganismos.

## II INTRODUCCION

### II. 1 Mecanismos de defensa en los invertebrados.

Los estudios sobre la inmunidad de invertebrados como en los moluscos, insectos y crustáceos (1,2) se han dirigido a la identificación de los eventos celulares (3) y la naturaleza molecular de los factores séricos (4) que participan en la eliminación de los microorganismos patógenos. Los mecanismos de defensa que se han identificado como la degranulación que da lugar a la liberación y la activación de un sistema multienzimático (5, 6); la actividad fagocítica; la formación de nódulos, la encapsulación (8, 9) y la síntesis de factores séricos (10). Los mecanismos de inmunidad se sustentan en la interacción molecular entre los factores séricos y receptores de superficie de la célula, o bien entre los receptores de superficie celular y elementos del patógenos (11). Los sistemas de defensa en los artrópodos contra microorganismos oportunistas e invasores se efectúan principalmente a través de los hemocitos en circulación y células que se encuentran asociados a algún tejido. Algunos hemocitos como los granulocitos poseen actividad fagocítica, en los cuales diversos factores séricos influyen aparentemente en esta actividad (12). Tal como el sistema de la profenoloxidasa, este sistema multienzimático es activado por diversos componentes de la pared de levaduras y bacterias. Específicamente en la respuesta celular. Hasta el momento, se desconocen los mecanismos que regulan la producción y la función de los hemocitos, pero es evidente que tales procesos requieren señales de comunicación intercelular que los regulen. Es posible que participen los grupos

celulares encargados de reconocer y eliminar a los organismos patógenos que atacan a los invertebrados (12). Los hemocitos de crustáceos han sido clasificados, de acuerdo a sus características morfológicas y funcionales. Sin embargo estas clasificaciones no son aplicables a todas las especies del grupo de los crustáceos dulceacuícolas, dando lugar a controversias para interpretar los diversos procesos celulares y bioquímicos que intervienen en los mecanismos inmunológicos (37).

Dentro del grupo de moléculas séricas que participan en los mecanismos de defensa de los invertebrados, se ha demostrado que las lectinas poseen gran relevancia a nivel evolutivo, ya que se encuentran en prácticamente todos los niveles de la escala evolutiva y particularmente en el grupo de los crustáceos (13,14), ya que participan en el reconocimiento del material extraño. Las lectinas han sido consideradas como un mecanismo primario de reconocimiento de células propias en especies primitivas del reino animal tal como las esponjas (15, 16). Las lectinas son proteínas o glicoproteínas con especificidad por los carbohidratos que conforman la superficie de las células e inducen aglutinación. Esta característica ha permitido sugerir que su función podría ser la de favorecer la actividad fagocítica, como una opsonina (14) y modular de esta forma la estimulación de las reacciones séricas y celulares en estos organismos. Se ha sugerido que las lectinas también pueden participar en algunos procesos de regulación endócrina. Se ha propuesto que estas moléculas podrían tener una evolución convergente con las inmunoglobulinas, las cuales son consideradas como un mecanismo de defensa específico para vertebrados, aunque también se ha demostrado que los vertebrados poseen lectinas (17). La pista de la evolución de las Inmunoglobulinas desaparece a nivel de los ciclostomas (el vertebrado mas primitivo) esto permite

suponer que la evolución de los anticuerpos es el mediador de las estrategias de defensa como un eslabón para los organismos que generalmente tienen poca progenie, con una vida relativamente larga, y son parte de poblaciones escasas. Tales especies podrían tener poca probabilidad de generar variantes genéticas que podrían favorecer la adaptación (18). Esto propone que los vertebrados desarrollan una estrategia en la cual la selección ha cambiado desde los niveles de población a los niveles celulares. Por otra parte, se tiene idea que los invertebrados han sido básicamente de existencia corta, que son capaces de autoreproducirse al enfrentarse a problemas ambientales, y esto no necesariamente por un mecanismo de defensa sofisticado. Los invertebrados han estado bajo presiones selectivas teniendo que sobrevivir a la maduración sexual para lograr sucesos reproductivos. Se ha sugerido que la respuesta inmune específica y de memoria es restringida para las especies de vertebrados. Se considera que la mayoría de los mecanismos de defensa de los invertebrados es una forma de diferenciación hacia lo no propio, que está restringida a las respuestas primitivas de fagocitosis y encapsulación. Esto hace suponer que los invertebrados podrían reconocer sus mismos constituyentes, pero que solo los vertebrados reconocen organismos extraños de una manera selectiva (19). Esto nos indica que algunos invertebrados muestran una inmunocompetencia que le permite preservar su integridad (18).

Diversos estudios han demostrado la presencia de aglutininas en crustáceos con capacidad para reconocer eritrocitos de vertebrados y proteínas exógenas, así como de opsoninas inducibles en moluscos, sipuncúlidos, anélidos, crustáceos, arácnidos, equinodermos, tunicados e insectos. La mayoría de los estudios concernientes a los sistemas de defensa de los insectos, confirman que la

naturaleza de la inmunidad humoral es también inducible. Los datos obtenidos sobre factores séricos inducibles han sido generados mediante la inyección de bacterias (20). Dentro de estos factores se ha dado a conocer una familia de proteínas antibacterianas de bajo peso molecular identificadas en la larva de polilla *Cecropia* como la cecropina. Otras proteínas antibacterianas han sido encontradas en varias especies de insectos (19, 21). Estas proteínas proveen en periodos cortos de protección no específica, pero aparentemente no guardan homología estructural con moléculas como las inmunoglobulinas, ni en el modo de acción (19). Las proteínas antibacterianas son muy eficientes como protección de un organismo a infecciones, sin embargo, ellas pueden representar el único mecanismo de defensa natural necesario por insectos para el manejo del bombardeo del sistema por la flora intestinal durante eventos metamórficos (22). Las lectinas en los invertebrados se han encontrado asociadas a membranas celulares o disueltas en la hemolinfa (23). En los crustáceos, las lectinas reconocen estructuras complejas de carbohidratos, generalmente hacia los que contienen ácido siálico. En ciertas especies la actividad biológica de las lectinas dependen de calcio (24) estas glicoproteínas son denominadas lectinas C por ser dependientes de cationes bivalentes ( $Ca^{++}$ ). Otros estudios han demostrado que la presencia de lectina incrementa la actividad fagocítica, ya que estas pueden funcionar como moléculas de adhesión y al opsonizar al agente patógeno, desencadenan la actividad fagocítica u otros eventos celulares como son la formación de nódulos y la encapsulación (25). Por esto se considera que las lectinas representan un factor que modula la respuesta de la actividad inmune en los invertebrados. Algunos trabajos sobre el potencial inmunológico de la cucaracha *Periplaneta americana*,

han evidenciado la existencia de la respuesta inmune humoral adaptativa en el sistema de defensa de invertebrados (18).

## II.2 Importancia del Langostino *Macrobrachium rosenbergii*.

La demanda de alimentos ricos en proteínas ha propiciado el desarrollo de cultivos intensivos de organismos invertebrados marinos como el camarón y, dulceacuícolas como el langostino. En países en desarrollo se han establecido programas de granjas comunitarias dedicadas al cultivo de algunas especies de invertebrados como el langostino *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan), conocido como langostino malayo, asiático o camarón gigante de agua dulce.

La tolerancia de esta especie para su manejo en cultivos semi-intensivos y su resistencia a las variaciones de los principales parámetros ambientales, lo hacen atractivo para el desarrollo acuícola, nutricional y para su comercialización. Por esta razón este organismo es considerado una especie de importancia económica para el desarrollo acuícola en el estado de Morelos. Los monitoreos de sanidad acuícola en otros países dedicados al cultivo y engorda del langostino como Tailandia y Hawaii, han revelado que en los diferentes estadios de desarrollo de esta especie pueden ser afectados por diversos patógenos enzoóticos tales como las Rickettsias, virus (parvovirus-like), bacterias quitinolíticas y filamentosas (*Vibrio* sp., *Beneckea* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp y *Mycobacterium* sp.); protozoarios (*Epistylis* sp., *Zoothamnium* sp., *Lagenophrys* sp. y *Vorticella*); hongos (*Lagenidium callinectes*, *Sirolopidium* sp., *Fusarium* y Tricomisetos); insectos (huevecillos de *Ramphocorixa acuminata*); tremátodos

(*Carneophallus choanophallus*), nemátodos (*Angiostrongylus cantonensis*) e isópodos (*Probopyrus* sp), los cuales pueden llegar a causar merma en la producción (1, 2).

### II.3 Conceptos básicos de la inmunocitoquímica.

La inmunocitoquímica es un método que permite la localización de un antígeno. Las propiedades de reconocimiento molecular en esta reacción son altamente específicas y poseen una gran fuerza de interacción. Un antígeno puede ser identificado por uno o más anticuerpos. Cuando este anticuerpo está marcado con un fluorocromo o por material radio-opaco, puede ser visualizado en el microscopio de luz o por el microscopio electrónico de transmisión. La inmunocitoquímica ha dado valiosas contribuciones en el reconocimiento de una diversidad de sustancias (26). Los anticuerpos (glicoproteínas globulares por lo que se les denomina inmunoglobulinas) son las moléculas efectoras de la respuesta inmune humoral y se unen específicamente al antígeno el cual, estimuló su formación. La unión antígeno-anticuerpo favorece la acción de células con actividad fagocítica. La función de los anticuerpos es identificar los elementos invasores, unirse a ellos mediante el epítotope (o determinante antigénico) e iniciar así el proceso que lleva a cabo su eliminación.

En la mayoría de los mamíferos se han identificado cinco clases de Inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), que difieren de tamaño, coeficiente de sedimentación, composición de aminoácidos y azúcares. Todas las inmunoglobulinas reconocen algún antígeno en forma específica, pero se



diferencian en cuanto a su localización en los tejidos, o por su reconocimiento con otras proteínas. Estas proteínas tienen forma de "Y" (Figura 1); están constituidas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos pesadas (H) y dos ligeras (L). Estas cadenas están unidas por puentes disulfuro (-S-S). Cada brazo de la "Y" ha sido designado fragmento Fab (antigen binding Fragment), que se une al antígeno en forma independiente, lo que permite que el anticuerpo sea divalente. El resto de la molécula (fragmento Fc), no participa en la unión con el antígeno, sino que es reconocido por receptores celulares específicos y contribuye a la efectividad del proceso mediante el cual, la molécula o cuerpo extraño es destruido. La región carboxilo terminal (-COOH) de todas las cadenas es casi idéntica, mientras que la región amino terminal (-NH<sub>2</sub>) se diferencia en todos los anticuerpos porque determina el grado de especificidad. Las inmunoglobulinas están formadas por dominios que contienen aproximadamente 110 aminoácidos, los dominios presentes en la región amino terminal, de la cadena ligera (VL región variable de la cadena ligera) y cadena pesada (VH región variable de la cadena pesada) y el resto CL (regiones constantes de la cadena ligera) y CH (para las regiones constantes de la cadena pesada). Los cambios de los aminoácidos en las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la ligera no están distribuidos de manera homogénea, algunas de las porciones de las cadenas manifiestan ser más variables que las otras, por lo que se les denomina regiones hipervariables (27).

Los anticuerpos policlonales (Fig 3), tienen gran aplicación en la inmunocitoquímica y se pueden producir en animales de laboratorio por medio de técnicas relativamente simples. En primer lugar se inyecta el antígeno en presencia de adyuvantes a un animal de experimentación como conejo, cabra, ratón, etc. Los

anticuerpos así preparados están dirigidos contra diferentes porciones del antígeno, las cuales son denominadas determinante antigénico o epítope (27).

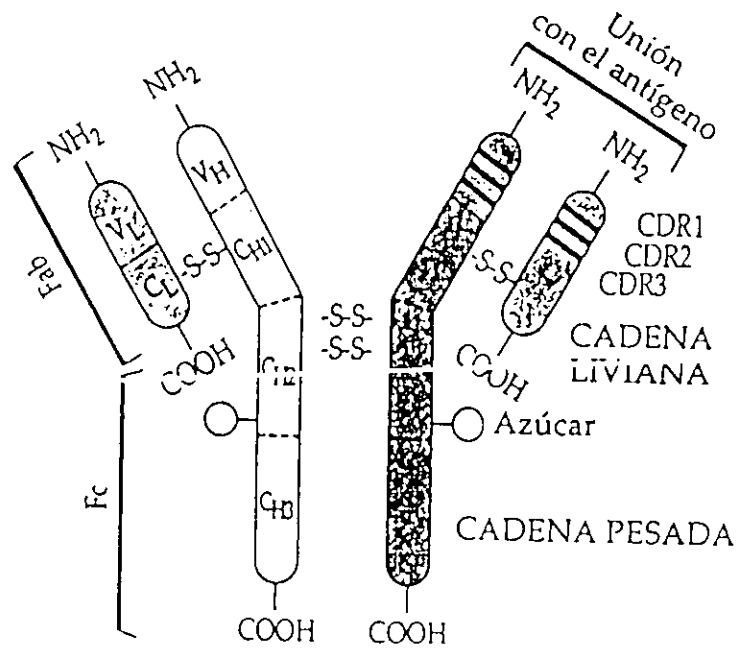
La producción y utilización de anticuerpos monoclonales (Fig 2), constituyó una revolución inmunológica en las últimas décadas. A partir de 1975, C. Milstein y G. Khler desarrollaron un sistema de producción de anticuerpos en células mielomatosas (hibridomas), estos anticuerpos poseen gran especificidad por un determinante antigénico y se producen a gran escala, por lo cual, estas moléculas comenzaron a utilizarse en el diagnóstico, de la investigación básica, en la industria y la medicina (27). El anticuerpo monoclonal es aquel producido por las células originadas en un solo clon de linfocitos B. Como todas las células son idénticas producen una única clase de moléculas de inmunoglobulinas que reconocerá a un solo epítope del antígeno (Fig 2). Es decir, aislando una célula plasmática e induciendo su proliferación *in vitro* se obtendrá un clon celular secretor de una clase de anticuerpo. Estos anticuerpos son un reactivo altamente específico, ya que reconocen una única estructura (epítope) presente en el antígeno reconocido (27).

Los anticuerpos policlonales son una mezcla de poblaciones distintas de linfocitos B que han sido estimulados por un mismo antígeno, originando cada uno una clona celular (conjunto de células idénticas que provienen de una única célula progenitora). Debe destacarse que es imposible, por medios físicos y químicos, aislar una de las poblaciones de anticuerpos a partir de la mezcla (27) (Fig. 3).

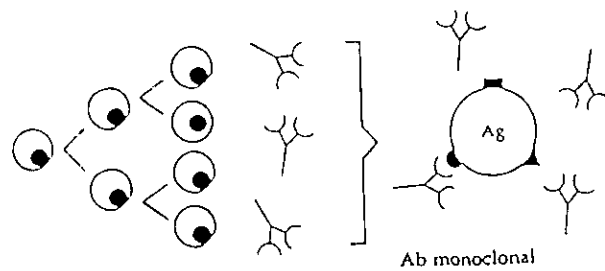
El método general en inmunocitoquímica es unir al anticuerpo con marcadores electrodensos al haz de electrones, para poder ser detectables. Estos marcadores pueden ser: 1) moléculas orgánicas con estructuras electro-opacas

como la ferritina que contiene hierro; la hemocianina (que contiene cobre) y virus, generalmente estos marcadores son utilizados en microscopía electrónica de barrido por su tamaño; 2) las enzimas, que son adheridas a una inmunoglobulina con la intención de usar sus propiedades de actividad catalítica para producir una reacción insoluble que tenga un producto visible al microscopio electrónico, la mayoría se utiliza en sistemas enzimáticos que involucran a la peroxidasa de rábano y los complejos peroxidasa- antiperoxidasa, se adiciona peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina causando un precipitado insoluble, para revelar la reacción se utiliza frecuentemente tetraóxido de osmio (Fig. 4 A y B). Los metales son los más utilizados como marcadores, el más común es el oro coloidal, que se puede adquirir en diferentes tamaños desde 3 nm en adelante, y su aplicación permite hacer doble localización con oro de diferentes tamaños (26, 28). El marcaje se puede realizar antes o después de ser incluido el material; regularmente si se desea conservar la antigenicidad, el marcaje se puede hacer antes de incluir el material, sin embargo el más utilizado es después de ser incluido el material. En el método directo para la localización (Fig. 5) se utiliza el anticuerpo primario marcado contra el antígeno, y en el método indirecto se expone el tejido o célula al anticuerpo primario y posteriormente al anticuerpo secundario marcado (Fig. 6). Otro método de marcaje es la proteína A acoplada a oro coloidal la cual reconoce el segmento Fc de la molécula de IgG (Fig. 7). En algunos casos se utiliza un primer anticuerpo marcado con biotina para ser localizado después con un complejo de estreptavidina-oro. Las reacciones pueden ser amplificadas usando anticuerpos policlonales marcados, los cuales pueden reaccionar con múltiples determinantes del anticuerpo primario (26, 27).

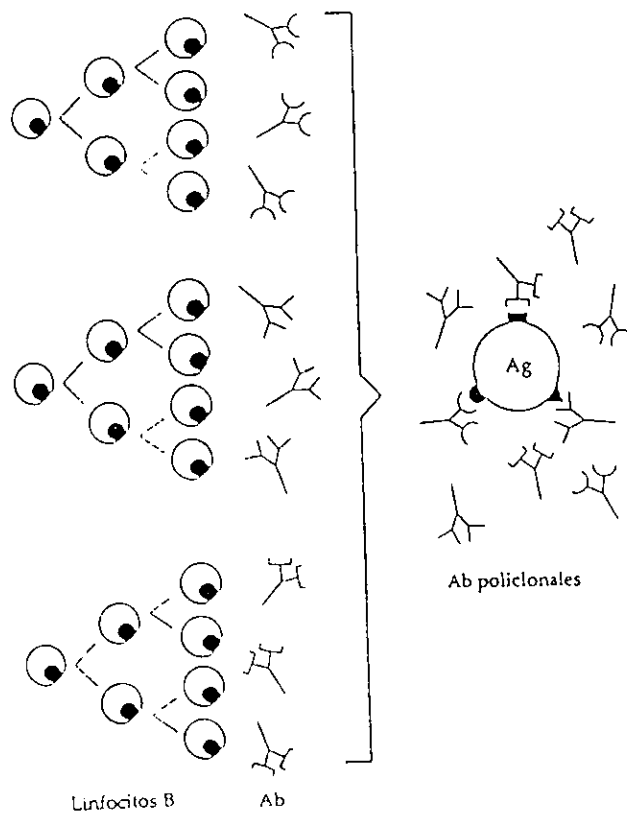
En los estudios de inmunocitoquímica la fijación es "suave", se sacrifica la calidad de la ultraestructura con la finalidad de mantener la antigenicidad ya que con el uso de los fijadores puede desnaturalizar, alterar o enmascarar el determinante antigénico. El glutaraldehído es un agente entrecruzador de grupos amino de las proteínas con los grupos aldehídos (agentes bifuncionales) que pueden reaccionar con el anticuerpo. Los restos no reactivos pueden unirse al IgG de moléculas no específicas, por lo que a pesar de ser un excelente fijador se utiliza en bajas concentraciones (por ejemplo al 0.5%) combinado con paraformaldehído al 4% o en algunas ocasiones no se utiliza. Las resinas que se emplean para la inclusión son generalmente hidrosolubles como LR White, glicolmetacrilatos y lowicril; las resinas hidrofóbicas Epoxi, son poco utilizadas debido a que obstaculizan el paso de los anticuerpos. Normalmente se realizan bloqueos con albúmina o suero normal no inmune con la finalidad de tapar los sitios o epítopes que puedan reaccionar inespecíficamente con el anticuerpo dando reacciones cruzadas. El contraste se realiza con acetato de uranilo y citrato de plomo, cuidando de que la reacción no enmascare el marcador. Las lectinas también se han utilizado debido a su especificidad para localizar carbohidratos de superficie celular, estas se utilizan en lugar del anticuerpo primario, para ser detectadas por microscopía electrónica se conjugan con enzimas, oro coloidal o moléculas electro-opacas (26, 28).



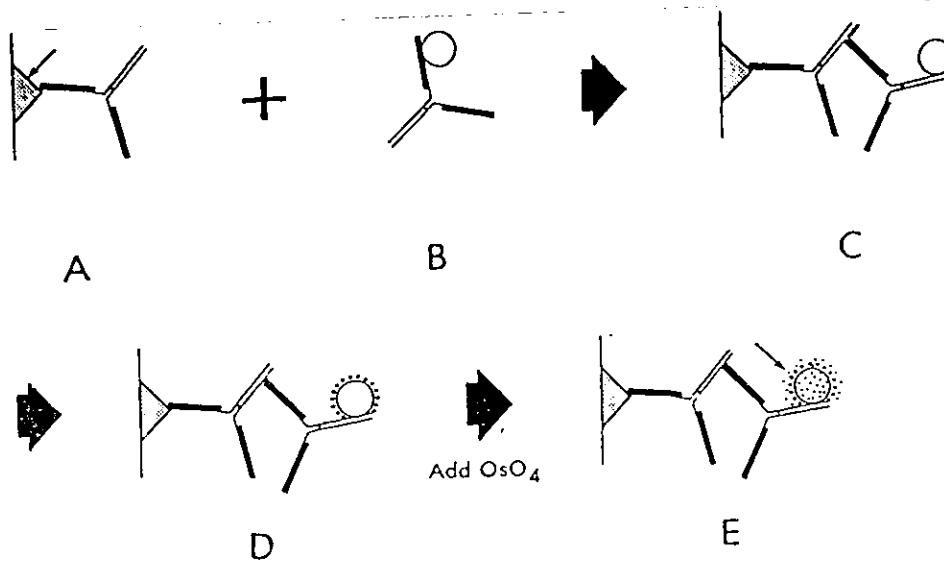
**FIG. 1.** Estructura de una molécula de IgG. Fab - sitio de unión con el antígeno, Fc - fragmento cristalisable (no participa en el reconocimiento del antígeno), -S-S. puentes disulfuro. NH<sub>2</sub>- región amino terminal, COOH.- región carboxilo terminal, VL.- región variable de la cadena ligera, VH.- región variable de la cadena pesada, CL.- región constante de la cadena ligera, CH.- región constante de la cadena pesada. (Esquema tomado de Retegui L. A., 1992)



**FIG. 2.** Formación de anticuerpos monoclonales. Muestra las células idénticas que producen una única clase de inmunoglobulinas que reconocen a un solo epítipo del antígeno (Ag). (Esquema tomado de Retegui L. A., 1992.)

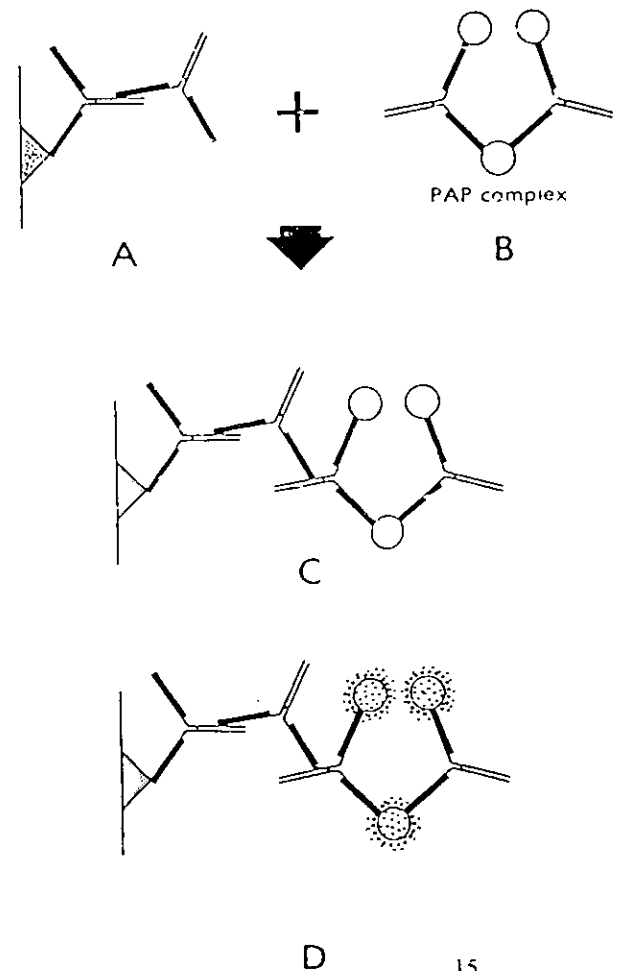


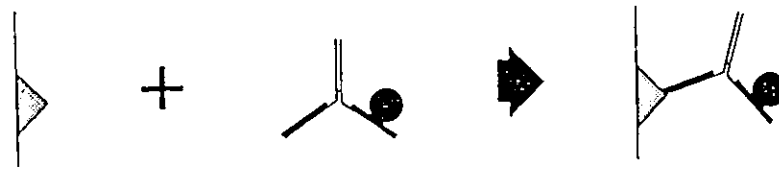
**FIG.3.** Formación de anticuerpos policlonales. Muestra una mezcla de poblaciones distintas de linfocitos B que se estimularon por un antígeno, dando lugar a una clona celular. Estos anticuerpos (Ab) reconocen a diferentes epítipos del antígeno (Ag). (Esquema tomado de Retegui L. A., 1992)



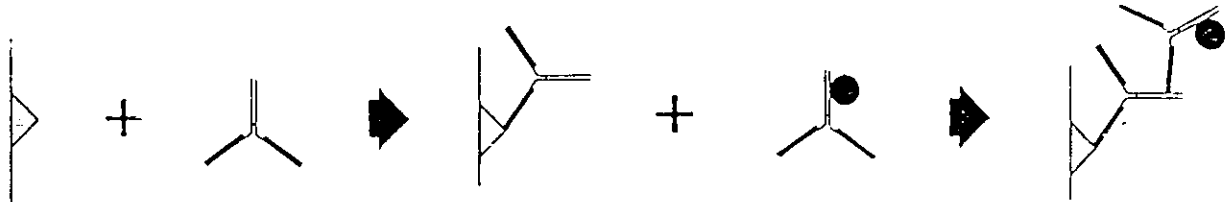
**Fig. 4 (A).** Pasos del método indirecto con peroxidasa: (A) el antígeno es atacado por el anticuerpo primario; (B) anticuerpo secundario en contra del anticuerpo primario es marcado con peroxidasa y ( C ) unión del anticuerpo primario con el anticuerpo secundario marcado. La adición de peróxido de hidrogeno y diaminobenzidina da lugar a la formación de un precipitado insoluble (D) el cual, se observa denso al microscopio electrónico después de la adición de osmio (E) (Esquema tomado de Bozzola, J. J. 1991).

**Fig. 4 (B).** Pasos de la técnica peroxidasa-antiperoxidasa (PAP): A) el antígeno a sido secuencialmente expuesto a los anticuerpos primarios y secundarios. B) el complejo PAP es adicionado después que los excesos de los anticuerpos primarios y secundarios han sido lavados ( C ). Este complejo reacciona con el anticuerpo secundario (el complejo PAP fue producido en la misma especie como el anticuerpo primario), (D) producto denso de la reacción formada por la adición de  $H_2O_2$  y diaminobenzidina después de la impregnación con osmio. (Esquema tomado de Bozola, J. J. 1991).

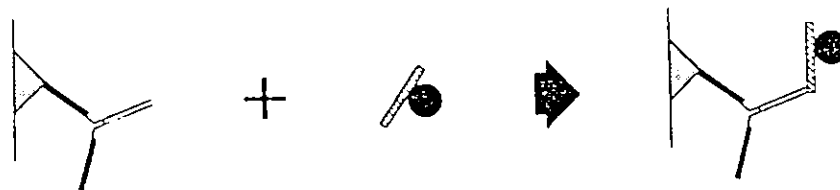




**FIG. 5.** Método de marcado directo. El antígeno es expuesto al anticuerpo primario que ha sido previamente conjugado con el marcador.



**FIG. 6.** Método de marcado indirecto. Se expone el anticuerpo primario (generalmente elaborado de una segunda especie) ante el antígeno (de la primer especie) y después de haberse unido el complejo antígeno-anticuerpo, se expone a un anticuerpo secundario marcado que ha sido producido para reaccionar en contra del IgG de la segunda especie. El resultado es una secuencia de dos capas de anticuerpos y un marcador.



**FIG. 7.** Localización utilizando proteína a marcada, es adicionada a un complejo antígeno anticuerpo. La proteína a se une al fragmento Fc de la molécula de IgG.

(FIG. 5, 6, y 7 son esquemas tomados de Bozola, J. J. 1991).



### III ANTECEDENTES

La inmunidad es un mecanismo de defensa que se activa específicamente en un organismo ante la presencia de agentes patógenos o moléculas extrañas genéticamente (29). Los estudios para conocer los mecanismos de inmunidad en esponjas, celenterados, artrópodos, anélidos, moluscos y equinodermos (15, 30), demuestran que todas las formas de vida han creado un sistema de defensa eficaz contra patógenos y parásitos. La inmunidad en los crustáceos como en los vertebrados, está dada por la cooperación de procesos celulares y humorales (30). Sin embargo, el sistema inmunológico de los invertebrados se caracteriza por la carencia de memoria, representado por las inmunoglobulinas de los vertebrados, así como por diversos grupos de células linfoides que poseen receptores de superficie que logran la identificación de los antígenos de histocompatibilidad (16).

La presencia del caparazón o exoesqueleto, específicamente en los crustáceos, constituye la primera barrera de protección ante la constante amenaza de patógenos (31). En estos organismos el medio interno circulante está conformado por la hemolinfa (constituida por el suero que transporta nutrientes, proteínas u hormonas) y los hemocitos (células circulantes), que participan en la eliminación de patógenos y colaboran de manera importante en la restauración de tejidos dañados (32). Los eventos bioquímicos que se desencadenan en la inmunidad de los crustáceos son escasamente conocidos. Sin embargo, al igual que en otros invertebrados se sabe que la respuesta celular se manifiesta en cooperación con factores séricos. La actividad biológica de cada tipo de hemocito juega un papel importante en las diferentes reacciones de defensa contra parásitos y patógenos que podrían entrar al hemocele a través de la cutícula, siendo los

hemocitos de los podocitos branquiales, los responsables para remover las proteínas y células envejecidas o microorganismos de la circulación, y por lo tanto estos hemocitos son considerados primordiales en el mecanismo de defensa (33, 34).

Los estudios sobre la clasificación de los tipos de hemocitos circulantes y su actividad biológica se han realizado en algunas especies como la langosta americana *Homarus americanus*, la langosta roja *Panulirus interruptus* (12), en el acocil *Procambarus clarkii* (35) y en los camarones *Sicyonia ingentis* y *Paneus californiensis* (45). De manera general estos autores han clasificado a los hemocitos en: 1) Hemocitos hialinos: caracterizados básicamente por la escasa presencia de gránulos citoplásmicos, escasas lisozimas y carencia de fagosomas. Mediante ensayos citoquímicos se ha considerado que este grupo de células inician la coagulación al sufrir la autólisis; 2) Los hemocitos granulares: llamados también granulocitos, son células que generalmente no muestran cambios morfológicos durante la coagulación y son subdivididos en dos tipos el primero comprende a las células con numerosos gránulos pequeños; estas células se caracterizan por presentar pseudópodos largos y delgados cuando son adheridos; al parecer son células que participan activamente en el reconocimiento de partículas extrañas. El segundo subtipo incluye a los hemocitos con gránulos citoplásmicos grandes y numerosos, el núcleo es pequeño; este grupo raramente presenta pseudópodos se ha sugerido que su función está dirigida hacia la encapsulación de patógenos y a la cicatrización de heridas. Algunos autores (12) hacen referencia a la gran heterogeneidad que existe en el número y tamaño de gránulos, lo que ha dado lugar a proponer que esta variabilidad está dada por una progresiva maduración celular (36). Con la finalidad de uniformizar los criterios

para la clasificación de los hemocitos se ha propuesto considerar también ciertos factores fisiológicos de cada especie como son: el estadio de desarrollo y el grado de maduración gonádica (13).

Se han realizado algunos estudios en el langostino *M. Rosenbergii*, para lograr la clasificación de los hemocitos teniendo en cuenta aspectos funcionales como actividad fagocítica, así como la participación de receptores específicos de la membrana de hemocitos en el reconocimiento de lo extraño (37, 38). Estos hemocitos se clasifican en tres grupos celulares, identificados por MET, MEB y contraste diferencial de interferencia CID (Nomarski) (Fig. 8), la separación en grupos se basó principalmente en la forma, tamaño, la relación núcleo-citoplasma, la presencia de ciertas estructuras como son las vesículas y gránulos citoplásmicos.

El uso de las lectinas como herramienta para la localización de carbohidratos de superficie en métodos histoquímicos por microscopía óptica y electrónica ha permitido detectar por ejemplo residuos de carbohidratos en las papilas gustativas del bagre europeo *Silurus glanis* en la que utilizaron lectinas biotiniladas y el complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (39). Por otra parte se ha mencionado que los hemocitos de los moluscos como el mejillón *Mytilus edulis* poseen sitios de unión con numerosos tipos de lectinas, lo que permite identificar subpoblaciones de células circulantes (40). Se han utilizado lectinas biotiniladas y conjugados de avidina en métodos de pre-inclusión en pruebas para residuos específicos de carbohidratos (41).

Se han realizado estudios sobre la localización de la lectina en los hemocitos

**Fig. 8.** Hemocitos del Langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Hemocitos fusiformes (F), hemocitos pequeños ovoides (P) y hemocitos grandes granulares (G). Normaski. (Fotografía tomada de Vázquez et al. 1997).

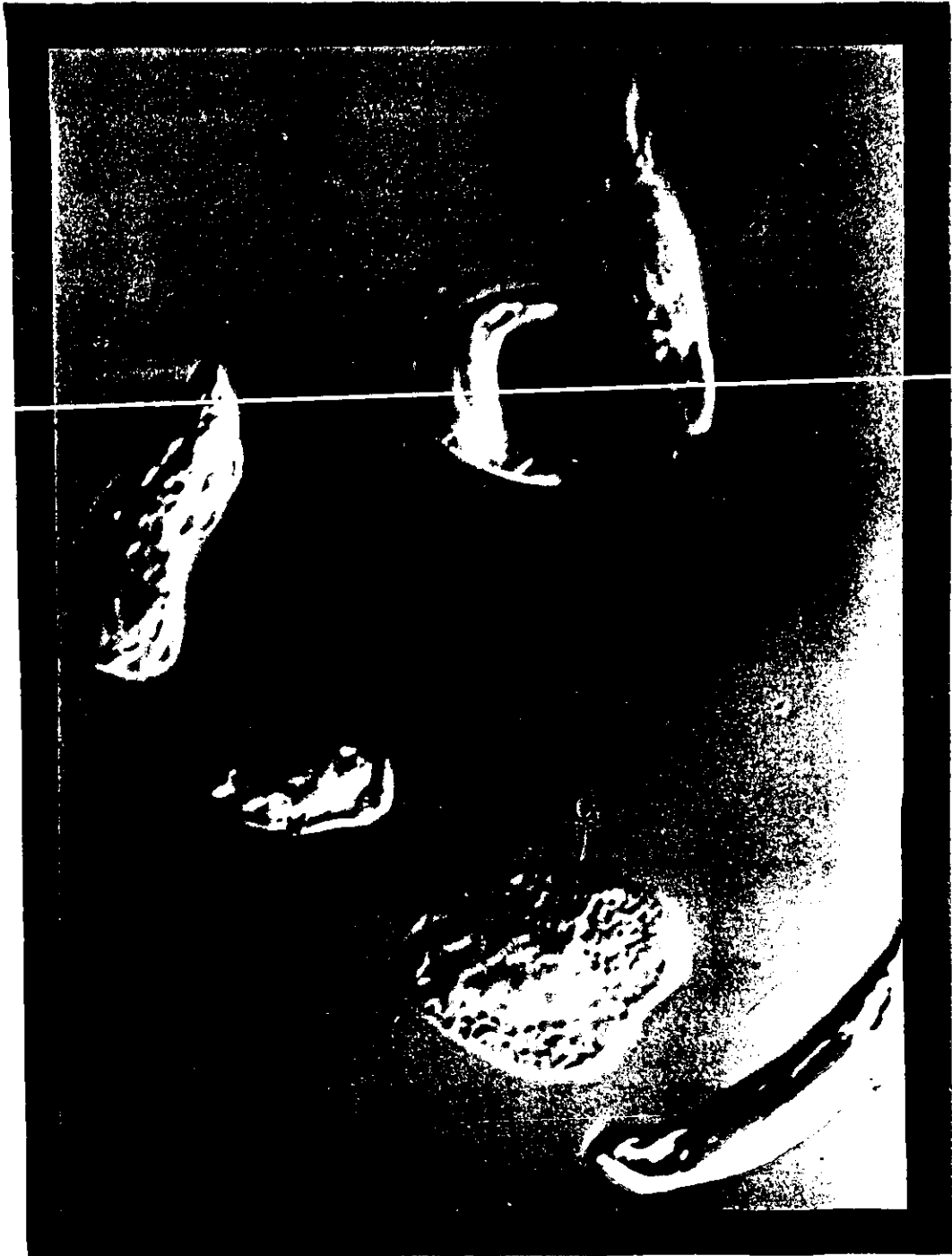


FIG.8

#### IV OBJETIVO Y METAS

##### OBJETIVO

Identificar la presencia de la lectina en los hemocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*.

##### METAS

1.- Identificar por Microscopía Electrónica de Transmisión, los diferentes tipos celulares presentes en la hemolinfa del langostino *Macrobrachium rosenbergii*.

2.- Determinar la presencia y localización de la lectina en los diferentes tipos de hemocitos del langostino mediante inmunocitoquímica por Microscopía Electrónica de Transmisión

## IV OBJETIVO Y METAS

### OBJETIVO

Identificar la presencia de la lectina en los hemocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*.

### METAS

1.- Identificar por Microscopia Electrónica de Transmisión, los diferentes tipos celulares presentes en la hemolinfa del langostino *Macrobrachium rosenbergii*.

2.- Determinar la presencia y localización de la lectina en los diferentes tipos de hemocitos del langostino mediante inmunocitoquímica por Microscopía Electrónica de Transmisión

de invertebrados por diversas metodologías. Por microscopía de fluorescencia se demostró la presencia de lectina sobre la membrana y citoplasma de granulocitos de insectos (53). Mediante ensayos de hemaglutinación se detectó la presencia de lectinas asociadas con hemocitos de la ostra *Crassostrea virginica* (23), posteriormente mediante inmunocitofluorescencia se demostró que la lectina de estos hemocitos se encuentra serológicamente relacionada con la lectina sérica de este organismo (50), como en el mejillón *Mytilus edulis* en el cual, también se utilizaron anticuerpos contra la lectina sérica para localizar la lectina en la membrana de los hemocitos (51). Mediante microscopía de luz e inmunocitoquímica en microscopía electrónica se obtuvo la localización de lectina en los gránulos de los hemocitos granulocitos del gusano de la remolacha *Spodoptera exigua* (51). Por otra parte las investigaciones para identificar la presencia de lectinas en los tejidos de *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata), utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra la lectina, (la cual posee especificidad por ácido siálico) y reconoce dos tipos de hemocitos granulares de esta especie; la presencia de la lectina se identifica además en los gránulos celulares, sobre la membrana y la lámina basal que rodea el hemocele; lo cual sugiere que la lectina puede funcionar como una molécula de reconocimiento en el sistema de defensa de este organismo (42). Las propiedades biológicas y estructurales primarias de componentes granulares extraídos de los hemocitos del cangrejo de mar que contienen una gran cantidad de sustancias antimicrobianas, indica que la lectina en organismos invertebrados se encuentra localizada en



posiciones estratégicas que le permiten ser una alternativa funcional, al estar en contacto con cualquier elemento extraño que logra ingresar a la circulación de estos animales y posiblemente regular alternativas celulares y moleculares que favorecen la eliminación de patógenos (43).

## V MATERIAL Y METODOS

### V.1 Obtención de organismos.

Los langostinos machos adultos sanos (Fig. 9), fueron colectados en el centro dulceacuícola el Huamuchil, Jojutla Morelos, donde se cultivan en estanques rústicos combinados con cultivos de peces.

Los reactivos utilizados fueron de grado microscopía electrónica obtenidos de diferentes fuentes comerciales.

### V.2 Ultraestructura de los hemocitos.

**EXTRACCION DE HEMOLINFA Y FIJACION.** Las células en suspensión se obtuvieron al extraer 0.5 ml. de la hemolinfa en la región pericárdica del langostino (Fig. 10), utilizando una jeringa (Apéndice I.1) conteniendo una mezcla de citrato de sodio como anticoagulante y glutaraldehído como fijador (Apéndice I.2), logrando así la fijación inmediata de las células, evitando la lisis celular. Se centrifugó inmediatamente a 1 800 r.p.m. por 5 min. a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. Al botón celular se le adicionó glutaraldehído al 1.5% incubando por una hora. Para eliminar el fijador se realizaron tres lavados al paquete celular durante 10 min. cada uno con PBS (Apéndice 1.3).

**POSTFIJACION.** El paquete celular se pasó a tubos eppendorf y se postfijó con tetróxido de osmio al 2% (Apéndice I.4) una hora a temperatura ambiente.

Lavándose posteriormente 3 veces con PBS por 10 min. cada lavado para eliminar el osmio.

**DESHIDRATACION.** Esta se llevó a cabo con alcoholes graduales del 70%, 80%, 96% por 10 min. cada uno y dos cambios con alcohol absoluto de 10 min. cada uno (Apéndice I.5). Posteriormente se realizaron tres cambios de óxido de propileno por 10 min. cada uno.

**PREINCLUSION E INCLUSION.** La preinclusión se realizó con una mezcla de resina epóxica (glicidether 100) con oxido de propileno en proporción 1:1 v/v por 15 min. en seguida un cambio de resina-óxido de propileno 2:1 v/v por 15 min. Finalmente la inclusión con la resina pura antes mencionada a 60°C por 24 hrs.

**CORTES.** Se realizaron en un ultramicrotomo MT2 Sorval (Fig. 11). Los cortes semifinos se colectaron con un asa y se colocaron sobre un portaobjetos, tiñiéndolos con azul de toluidina para su observación al microscopio de luz. Los cortes ultrafinos para microscopía electrónica de transmisión fueron colectados y montados en rejillas de cobre cubiertas previamente con membrana de formvar al 3%.

**CONTRASTE.** Los cortes ya montados en las rejilla se contrastaron con acetato de uranilo al 3% por 10 min. (Apéndice I.6) y citrato de plomo al 0.3% por 6 min. (Apéndice I.7).

**FOTOGRAFIAS.** Las observaciones y las fotografías se llevaron a cabo en un microscopio electrónico de transmisión Karl Zeiss EM10 (Fig. 12).

**REVELADO.** Se realizó con ayuda de un amplificador (Fig. 13).

## DESCRIPCION GENERAL DEL PROCESAMIENTO DE LAS CELULAS PARA ULTRAESTRUCTURA.

Extracción de la hemolinfa con solución citrato de sodio-glutaraldehído  
(centrifugar 1800 r.p.m. 5 min.)



Fijación con glutaraldehído 1 hr. a Temperatura ambiente



Realizar 3 lavados con PBS 10 min. cada uno



Postfijación con tetróxido de osmio al 2% por una hora



3 lavados de 10 min. cada uno con PBS



Deshidratar con alcoholes graduales 70%, 80%, 96% 10 min. cada uno.

2 cambios de alcohol absoluto 10 min.

3 cambios de oxido de propileno 10 min. cada uno.



Preinclusión. oxido de propileno-glicidether 1:1 v/v 15 min.

oxido de propileno-glicidether 1:2 v/v 15 min.



Inclusión. resina pura (glicidether) 24 hrs. a 60°C



Cortes. Finos para microscopía de luz teñidos con azul de toluidina

cortes ultrafinos para microscopía electrónica en

rejillas de cobre cubiertas con formvar.



Contraste. Acetato de uranilo 3% 10 min.

citrate de plomo (0.03%) 6 min.



Observación al MET y toma de fotografías.



Revelado de fotografías.



LANGOSTINO

*Macrobrachium rosenbergii* (De Man)

FIG.9

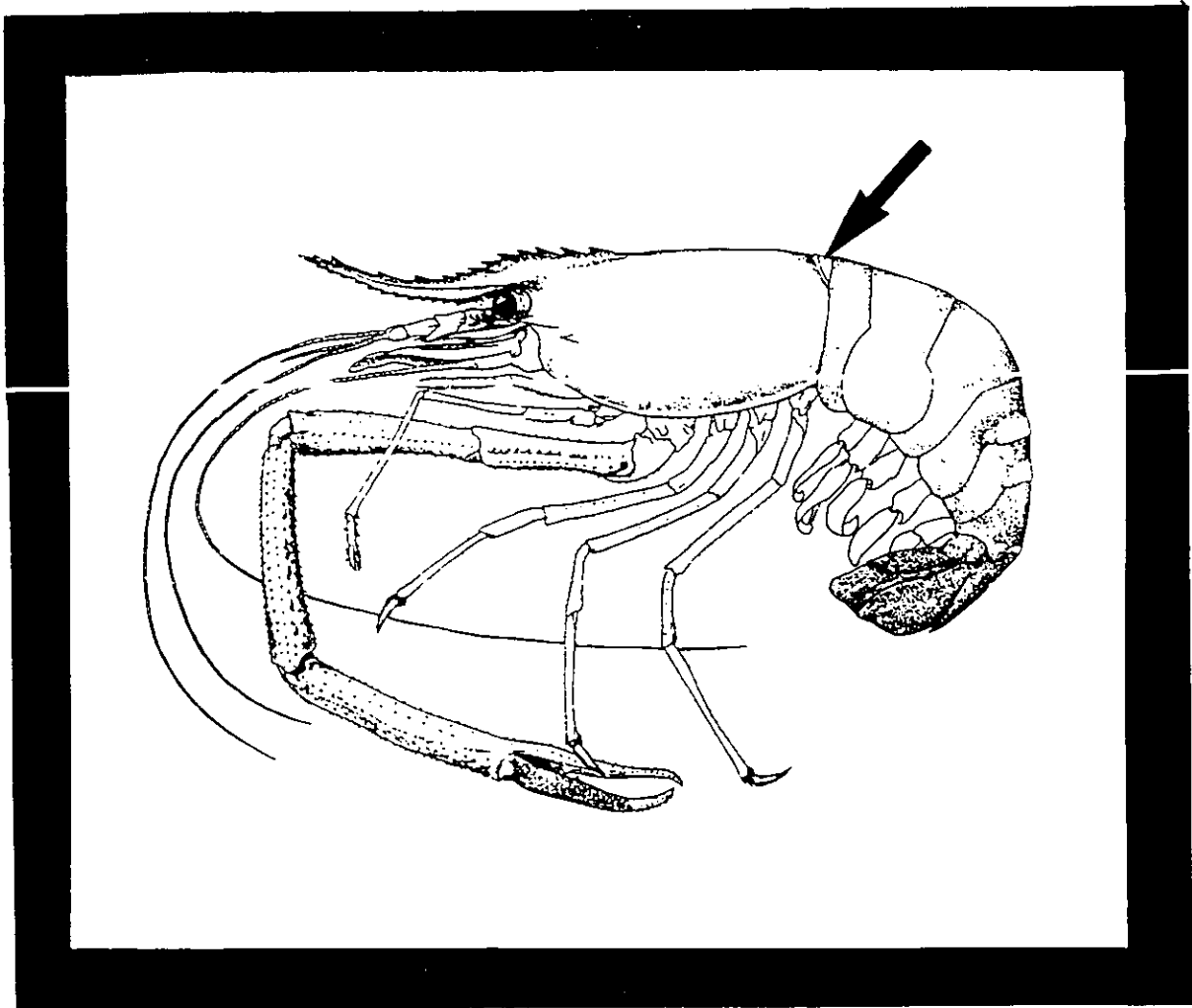


Fig. 10. Zona de extracción de la hemolinfa en la región pericárdica del langostino.

(Tomado de New, M.B. and S.Singholka 1984.)

**Fig. 11.** Ultramicrotomo MT2 Sorval.

**Fig. 12.** Microscopio Electrónico de Transmisión Karl Zeiss EM10.

**Fig. 13.** Amplificador.

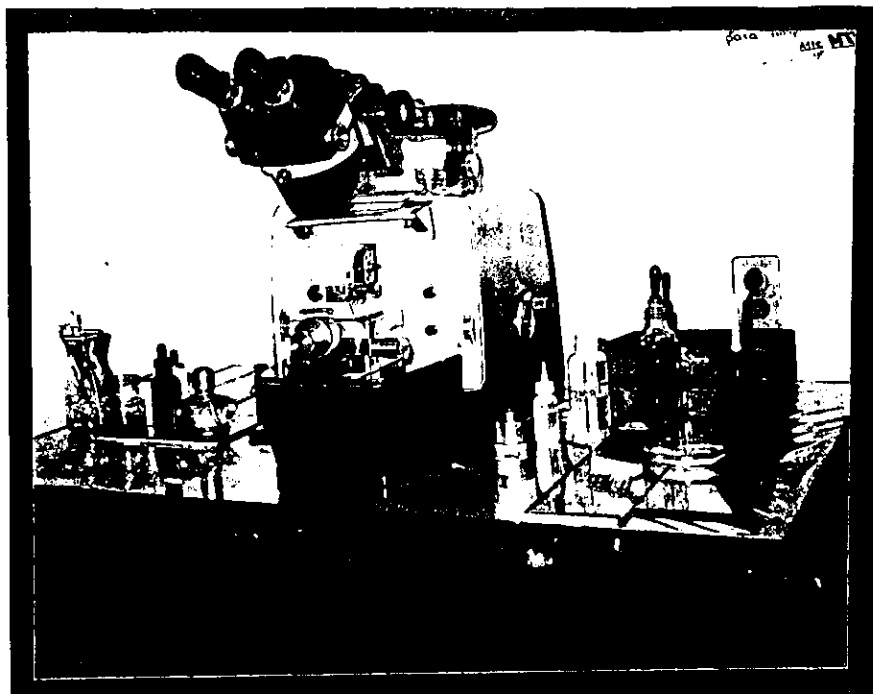


FIG.11

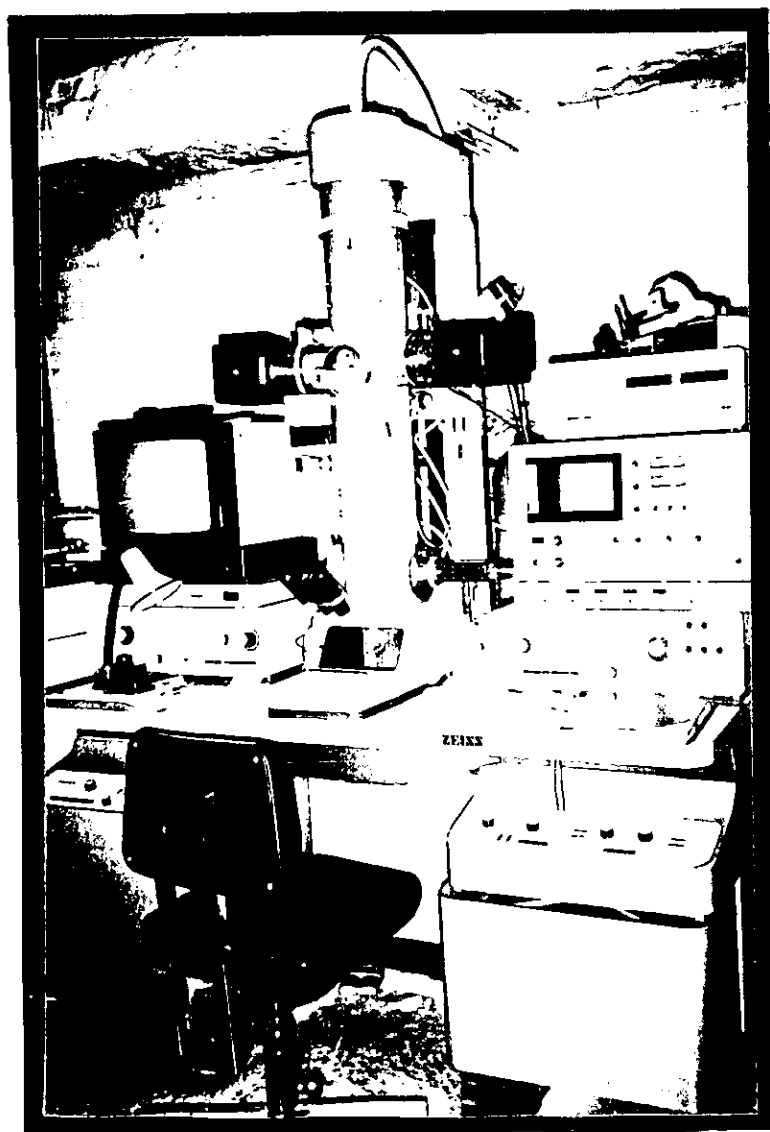


FIG.12

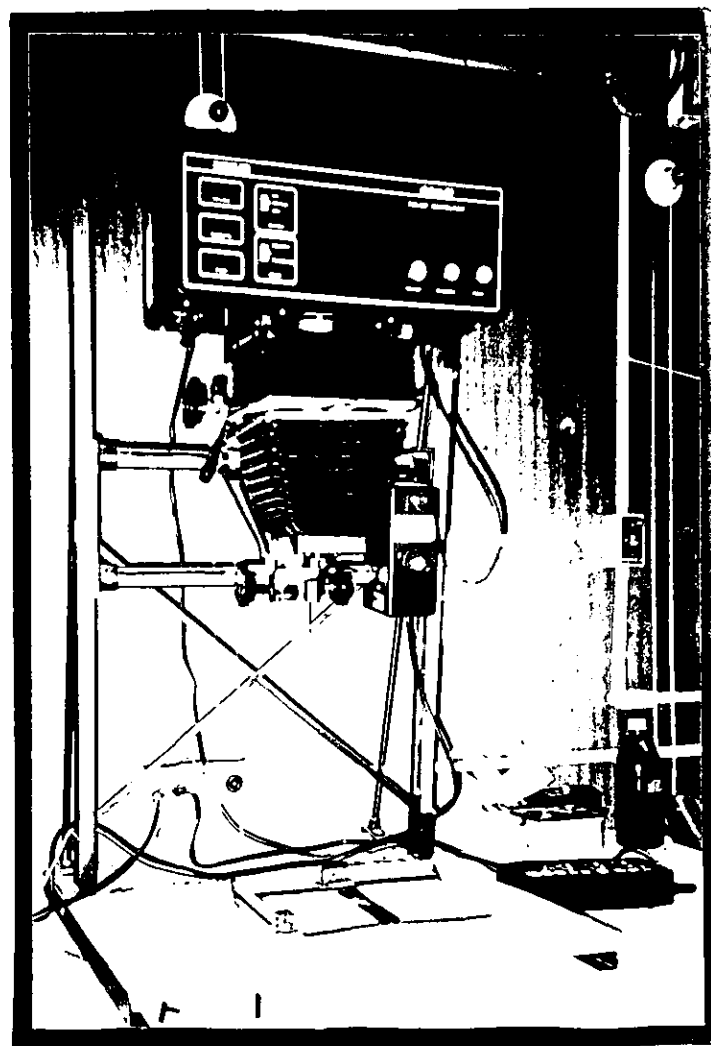


FIG.13



**V.3 Inmunocitoquímica para la determinación de la presencia de la lectina en los hemocitos.**

**EXTRACCION DE LA HEMOLINFA Y FIJACION.** Se extrajo 0.5 ml. de hemolinfa en la región pericárdica del langostino (Fig. 10) utilizando una jeringa de 5 ml. (Apéndice I.8), conteniendo 4 ml. de una solución de citrato de sodio al 3.8% como anticoagulante (2 ml.) y como fijador una mezcla de paraformaldehído al 8% y glutaraldehído al 0.5% (2 ml.) (Apéndice I.8). Con este procedimiento se trata de mantener las células integra al momento de extraer la hemolinfa. Se centrifugó a

1 800 r.p.m. durante 5 min. Posteriormente se decantó y al botón celular se le adicionó solución fijadora (paraformaldehído al 4% con glutaraldehído al 0.25%) incubándose una hora a 4°C. El fijador fue eliminado lavando el paquete celular 3 veces con PBS (Apéndice I.3) por 10 min. cada uno a 4°C. Se centrifugó a 1 800 r.p.m. durante 5 min. para obtener el botón celular que se pasó a tubos eppendorf.

**DESHIDRATACION.** Se efectuó gradualmente con etanol, partiendo de 30%, 50%, 80%, 90% con tiempos de incubación de una hora cada uno a 4 °C, finalmente se utilizó etanol absoluto realizando 3 cambios de 1 hora cada uno a 4°C.

**PREINCLUCION E INCLUSIÓN.** Se utilizó LR White (resina hidrofílica Medium Grade, Polyscience) con mezclas de la siguiente manera:

1) alcohol 100% - LR White 2:1 v/v por 3 horas a 4 °C.

2) alcohol 100% - LR White 1:2 v/v por 3 horas a 4°C.

3) LR White puro toda la noche.

4) 2 cambios de LR White puro de 1 hora cada uno a 4 °C.

5) La inclusión se realizó en cápsulas de gelatina tapadas por 24 hrs a 60°C.

CORTES. Se procesaron en un ultramicrotomo MT2 Sorval (Fig. 11). Los cortes semifinos de aproximadamente una micra, se tiñeron con azul de toluidina para observar los cortes al microscopio óptico para elegir el área donde se encontró mejor conservado el material. Los cortes ultrafinos de aproximadamente 90 nm fueron montados en rejillas de níquel cubiertas previamente con formvar. Antes de coleccionar los cortes se les pasaron superficialmente vapores de cloroformo y después se colocaron en la estufa a 60°C por 2 horas, previo a la aplicación de los anticuerpos, con la finalidad de evitar pliegues en las células.

## DESCRIPCION GENERAL DEL PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCITOS PARA INMUNOCITOQUIMICA.

Extracción de la hemolinfa con una mezcla de anticoagulante-fijador.  
(citrate de plomo 3.8%-paraformaldehído 3%/ glutaraldehído 0.5%)



Centrifugar 1800 r.p.m. por 5 min. y decantar



Fijar las células con una mezcla de paraformaldehído 4%/glutaraldehído 0.25%  
por una hora a 4°C



Realizar 3 lavados de 10 min. cada uno con PBS



Deshidratar con etanol 30%, 50%, 80%, 90% 1 hr. cada uno a 4°C  
y 3 cambios con alcohol absoluto de 1 hr. cada uno a 4°C



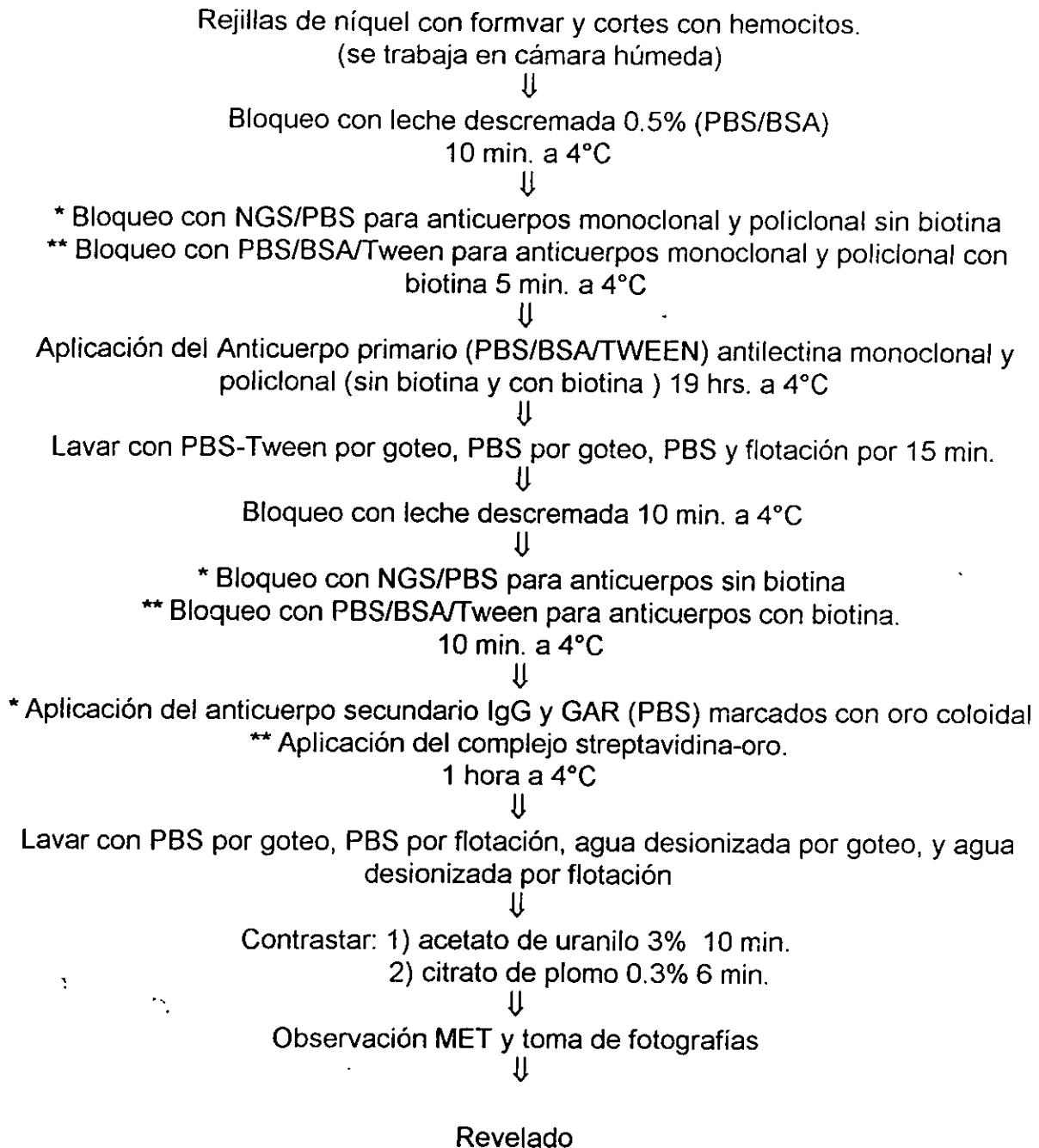
Preinclusión e Inclusión.

- 1) alcohol 100% - LR White 2:1 v/v por 3 horas a 4 °C.
- 2) alcohol 100% - LR White 1:2 v/v por 3 horas a 4°C.
- 3) LR White puro toda la noche.
- 4) 2 cambios de LR White puro de 1 hora cada uno a 4 °C.
- 5) La inclusión se realizó en cápsulas de gelatina por 24 hrs a 60°C.



Cortes finos para microscopía óptica y ultrafinos para microscopía electrónica

## DESCRIPCION GENERAL DEL METODO INDIRECTO EMPLEADO PARA LA LOCALIZACION DE LA LECTINA.



En el estudio de inmunolocalización se utilizaron 1) anticuerpos primarios y secundarios sin biotina y 2) anticuerpos primarios con biotina para su localización el complejo estreptavidina oro.

I. Anticuerpos monoclonales primarios anti-lectina sin biotina (obtenidos de líquido de ascitis de ratón), como anticuerpo secundario se utilizó suero de cabra anti-IgG de ratón, acoplado a oro coloidal (Tabla I).

II. Anticuerpos policlonales anti-lectina sin biotina (obtenidos en conejo), siendo el anticuerpo secundario suero de cabra anti-IgG de conejo G $\bar{A}$ R (guai anti-rabbit) acoplado a oro coloidal. (Tabla I).

III. Anticuerpo monoclonal anti-lectina acoplado a biotina (obtenido de líquido de ascitis de ratón), y para localizar la unión del anticuerpo con la lectina se adicionó un complejo de estreptavidina-oro (tabla I)

IV. Anticuerpo primario anti-lectina policlonal (de conejo) acoplado con biotina, para localizar la unión del anticuerpo. Las rejillas se pusieron en contacto con streptavidina-oro. (Tabla I).

Para los ensayos de inmunolocalización se evaluaron algunos parámetros como los tiempos de incubación, la concentración y los diferentes anticuerpos producidos contra la lectina sérica. Se eliminaron aquellos que presentaron un bajo título de interacción. Para cada experimento se colocaron diferentes rejillas control negativas al anticuerpo secundario o al complejo streptavidina-oro en su caso, estas rejillas en lugar de incubarse con el anticuerpo primario, se pusieron en contacto durante 19 hrs. en NGS/PBS en caso de utilizar los anticuerpos primario y

secundario sin biotina y con PBS/BSA/Tween (buffer de fosfatos, suero de albúmina bovino y Tween 20) cuando se utilizó el complejo streptavidina oro, siendo los siguientes pasos de la misma manera que en las demás rejillas de prueba.

Los lavados después de la incubación del primer anticuerpo se llevaron a cabo con PBS-Tween por goteo, PBS por goteo y PBS por flotación durante 15 minutos. Por consiguiente después de la incubación con el segundo anticuerpo se utilizó PBS por goteo, PBS por flotación 15 minutos; agua desionizada por goteo y finalmente agua desionizada por flotación 15 minutos. A continuación se secaron las rejillas y se contrastaron 10 minutos con acetato de uranilo al 3% mas 6 minutos con citrato de plomo al 0.03%, lavando entre cada contraste y al final del mismo con abundante agua desionizada. Posteriormente se dejaron secar las rejillas y se analizaron en MET (Fig. 12) para su observación y proceso de fotografías. Los negativos se revelaron y se imprimieron con la ayuda de un amplificador (Fig. 13).

ANTICUERPO	1º BLOQUEO	2º BLOQUEO	Ab PRIMARIO PBS/BSA/T. 19 HRS.	1º	3º BLOQUEO	4º BLOQUEO	Ab SECUNDARIO PBS 1 hr.	2º
I MONOCLONAL SIN BIOTINA	LECHE/PBS 10 MIN.	NGS/ PBS 1:20 5 MIN.	ANTILECTINA (RATON) 1:100	L	LECHE/PBS 10 MIN.	NGS/PBS 1:20 10 MIN.	IgG 10 nm & 1:40	L
II POLICLONAL SIN BIOTINA	LECHE/PBS 10 MIN.	NGS/PBS 1:20 5 MIN.	ANTILECTINA (CONEJO) 1:100 Y 1:200	A	LECHE/PBS 10 MIN.	NGS/PBS 1:20 10 MIN.	GAR 15 nm && 1:40	A
CONTROL SIN BIOTINA	LECHE/PBS 10 MIN.	NGS/PBS 1:20 5 MIN.	NGS/PBS 1:20 5 MIN.	V	LECHE/PBS 10 MIN.	NGS/PBS 1:20 10 MIN.	MONOCLONAL & POLICLONAL &&	V
III MONOCLONAL CON BIOTINA	LECHE/PBS 10 MIN.	PBS/BSA/TWEEN 20 MIN.	ANTILECTINA (RATON) 1:120	A	LECHE/PBS 10 MIN.	PBS/BSA/TWEEN 20 MIN.	COMPLEJO STREPTAVIDINA- ORO 20 nm 1:80	A
IV POLICLONAL CON BIOTINA	LECHE/PBS 10 MIN.	PBS/BSA/TWEEN 20 MIN.	ANTILECTINA (CONEJO) 1:120	D	LECHE/PBS 10 MIN.	PBS/BSA/TWEEN 20 MIN.	COMPLEJO STREPTAVIDINA- ORO 20 nm 1:80	D
V CONTROL MARCADOS CON BIOTINA	LECHE/PBS 10 MIN.	PBS/BSA/TWEEN 20 MIN.	PBS/BSA/ TWEEN	O	LECHE/PBS 10 MIN.	PBS/BSA/TWEEN 20 MIN.	COMPLEJO STREPTAVIDINA- ORO 20 nm 1:80	O

**TABLA I.** Metodología para la localización de la lectina en los hemocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Se utilizaron anticuerpos monoclonales y policlonales sin biotina, como anticuerpo secundario IgG 10 nm. y GAR 15 nm. respectivamente. También se probaron anticuerpos marcados con biotina y para su localización streptavidina oro 1:80. Se realizó en cámara húmeda.

- 1º - Primer lavado. (PBS-Tween por goteo PBS por goteo y PBS por flotación 15 min.)
- 2º - Segundo lavado (PBS por goteo, PBS flotación 15 min., agua desionizada por goteo y agua desionizada por flotación.

## VI RESULTADOS

### VI.1 Ultraestructura. Morfología de los hemocitos.

La técnica empleada para el análisis ultraestructural de los hemocitos de *Macrobrachium rosenbergii*, nos permitió identificar a las tres poblaciones celulares descritas previamente (37). La conservación de las células por la metodología aplicada, permito observar a las membranas celulares, el núcleo, la cromatina laxa y compacta, la cisterna perinuclear, con respecto al citoplasma se observaron organelos tales como retículo endoplásmico rugoso, ribosomas en grupos o distribuidos, gránulos con diferentes tamaños, densidad y forma, siendo esta última una característica importante de los hemocitos. Para la identificación de estos grupos celulares se consideró la forma, tamaño y relación núcleo citoplasma (37) (tabla II). Las características descritas a continuación se efectuaron con base en las observaciones de las fotografías de los hemocitos que se presentan en este trabajo.

1) Hemocitos pequeño ovoide (Fig. 14).- En esta célula se observa un núcleo grande y escaso citoplasma. Se encuentran la cromatina laxa y compacta, cisterna perinuclear, los gránulos citoplásmicos son escasos: densos, electrodensos y electrolucidos, retículo endoplásmico rugoso y ribosomas dispersos o en grupos.

2) Hemocitos Fusiforme (Fig. 15).- Su forma es larga y delgada. De mayor tamaño que los anteriores (37). En esta célula se observa el citoplasma mas abundante y el núcleo céntrico mas pequeño, la cromatina se manifiesta laxa y



compacta, cisterna perinuclear y abundantes gránulos citoplásmicos electrodensos de diferentes tamaños, formas y densidades. También identificamos al retículo endoplásmico rugoso y a los ribosomas que en general se encuentran agrupados entre los gránulos. En algunas células se observó ligera ruptura de la membrana celular, pero se conserva la ultraestructura sin haber extracción celular de componentes.

3) Hemocitos grande granular (Fig 16).- El núcleo es excéntrico, la cromatina se presenta en conformación laxa y compacta y se observa la cisterna perinuclear. El citoplasma es abundante, se pueden observar el retículo endoplásmico rugoso y ribosomas, que generalmente se encuentran agrupados entre los gránulos. Los gránulos son abundantes (ocupan gran parte del citoplasma), se encuentran gránulos densos de diferentes formas y gránulos electrolúcidos al haz de electrones.

Estas observaciones nos permiten proponer que en los tres tipos celulares presentes en la hemolinfa del langostino se reconocen características ultraestructurales particulares, que nos son de utilidad como referencia para el estudio posterior de inmunolocalización de la lectina presente en estas células (Tabla II).

HEMOCITO	ANCHO $\mu\text{m}$	LARGO $\mu\text{m}$	RELACION NUCLEO-CITOPLASMA	GRANULOS CITOPLASMICOS
PEQUEÑO OVOIDE	7.5 $\pm$ 2	13.7 $\pm$ 5	NUCLEO GRANDE Y CENTRICO, ESCASO CITOPLASMA	ESCASOS
FUSIFORME	4.8 $\pm$ 2	31.2 $\pm$ 12	EL CITOPLASMA Y EL NUCLEO SE ENCUENTRAN APROXIMADAMENTE IGUAL PROPORCION	ABUNDANTES
GRANDE GRANULAR	8.9 $\pm$ 4	24.7 $\pm$ 8	EL CITOPLASMA ES MAS ABUNDANTE QUE EL NUCLEO.	ABUNDANTES

TABLA II. Características de los tres tipos de hemocitos presentes en la hemolinfa del langostino *M. Rosenbergii*. (tomado de Vázquez 37, 38).

FIG. 14. Hemocito pequeño ovoide del langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Se fijo con glutaraldehído, se postfijó con tetraóxido de osmio y se contrastó con acetato de uranilo y citrato de plomo. Con esta metodología se logro conservar la célula en la cual se aprecia el núcleo (N), cromatina laxa y compacta (CR) y cisterna perinuclear (CP). En el citoplasma ( C ) se encuentran el retículo endoplásmico rugoso (RE), ribosomas (R), gránulos densos (G), gránulos electrodensos (GD) y gránulos electrolúcidos transparentes al haz electrónico (GE). 25,000X.

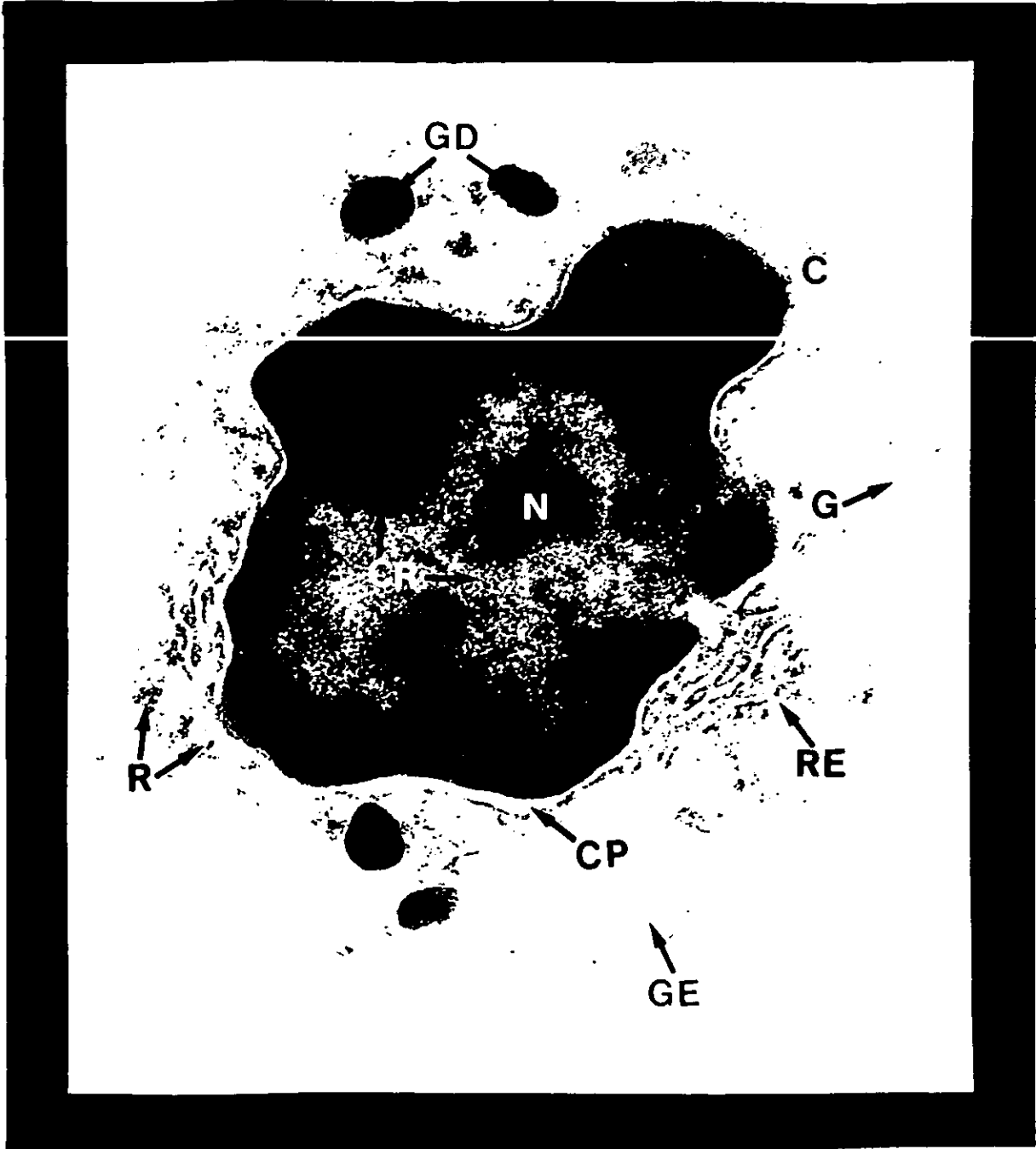


FIG.14

FIG. 15. (A Y B) Hemocitos fusiformes de *M. rosenbergii*. Se procesaron para ultraestructura fijándolos con glutaraldehído, postfijándolos con tetraóxido de osmio y contrastándolos con acetato de uranilo y citrato de plomo. La forma de estas células es alargada y delgada. El núcleo (N) de esta célula es céntrico, el citoplasma ( C ) abundante y la cromatina presenta conformación laxa y compacta (CR). Se aprecia la cisterna perinuclear (CP), ribosomas (R), retículo endoplásmico rugoso (RE), gránulos electrodensos (GD), gránulos densos (G) y gránulos electrolúcido (GE). A) 15,750X Y B) 12,500X.

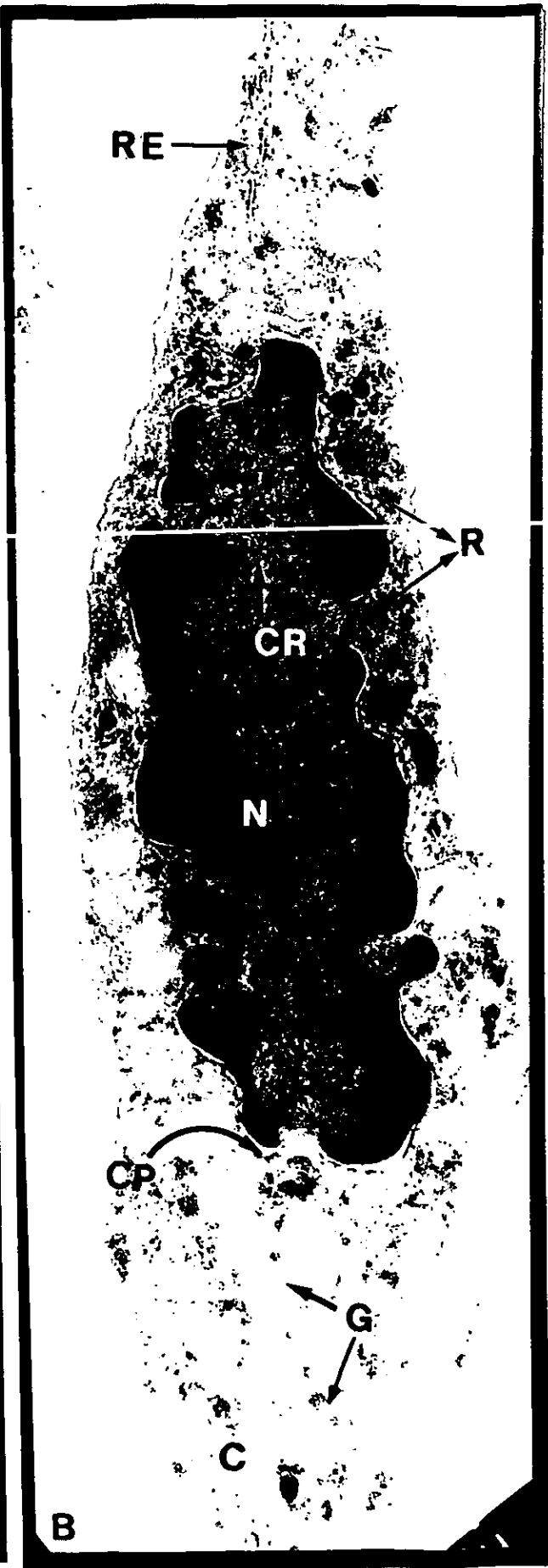
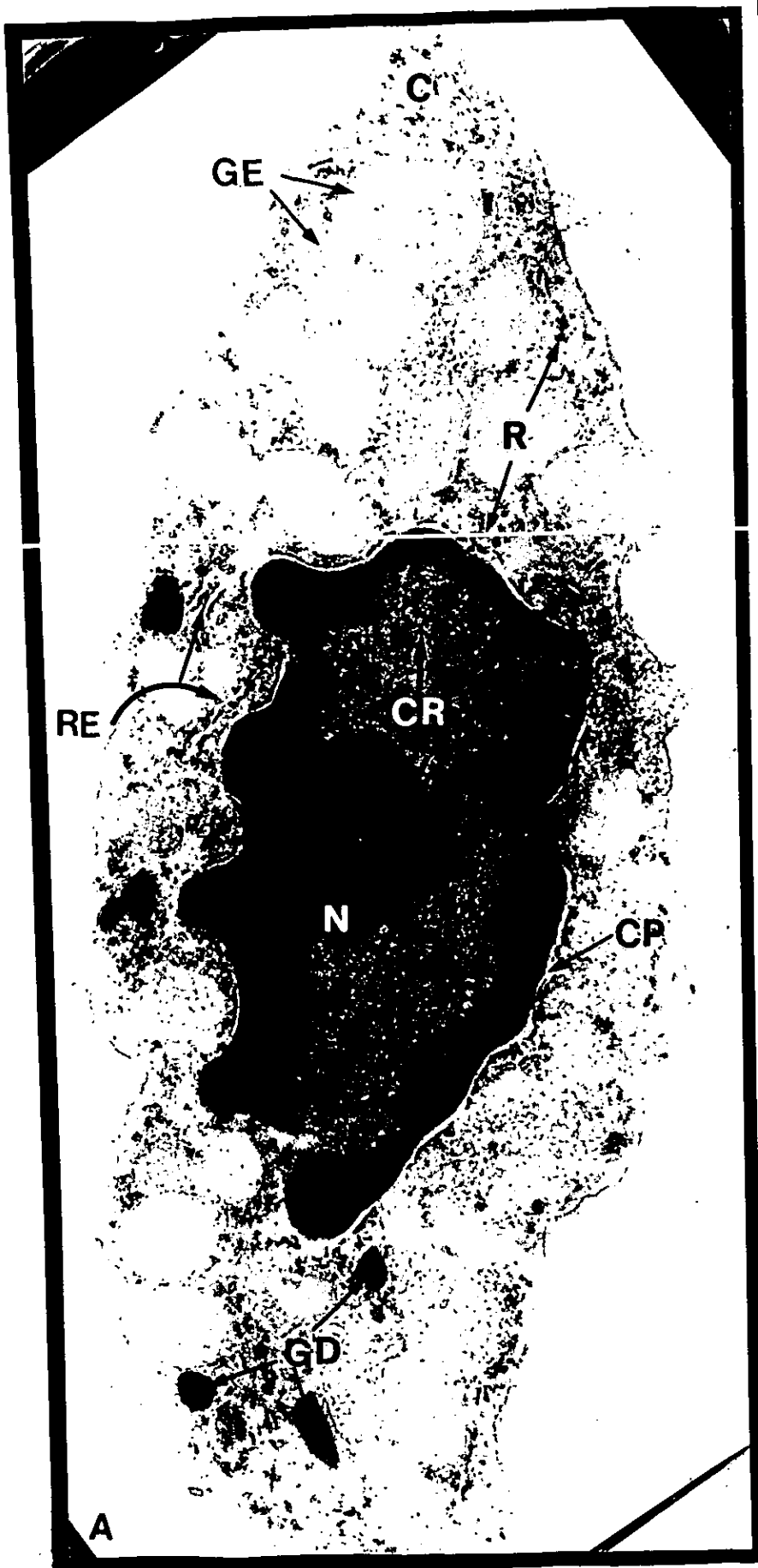


FIG. 15

**FIG. 16.** Hemocito grande granular de *M. Rosenbergii*, procesados para el análisis de ultraestructura fijados con glutaraldehído, postfijandolos con tetraóxido de osmio y se contrastó con uranilo-plomo. Se observa el núcleo (N), la cromatina laxa y compacta (CR), cisterna perinuclear (CP). En el citoplasma ( C ) se aprecian ribosomas (R), retículo endoplásmico rugoso (RE), gránulos electrolúcidos (GE) y gránulos densos (GD) que presentan diferentes formas. 31,250X.

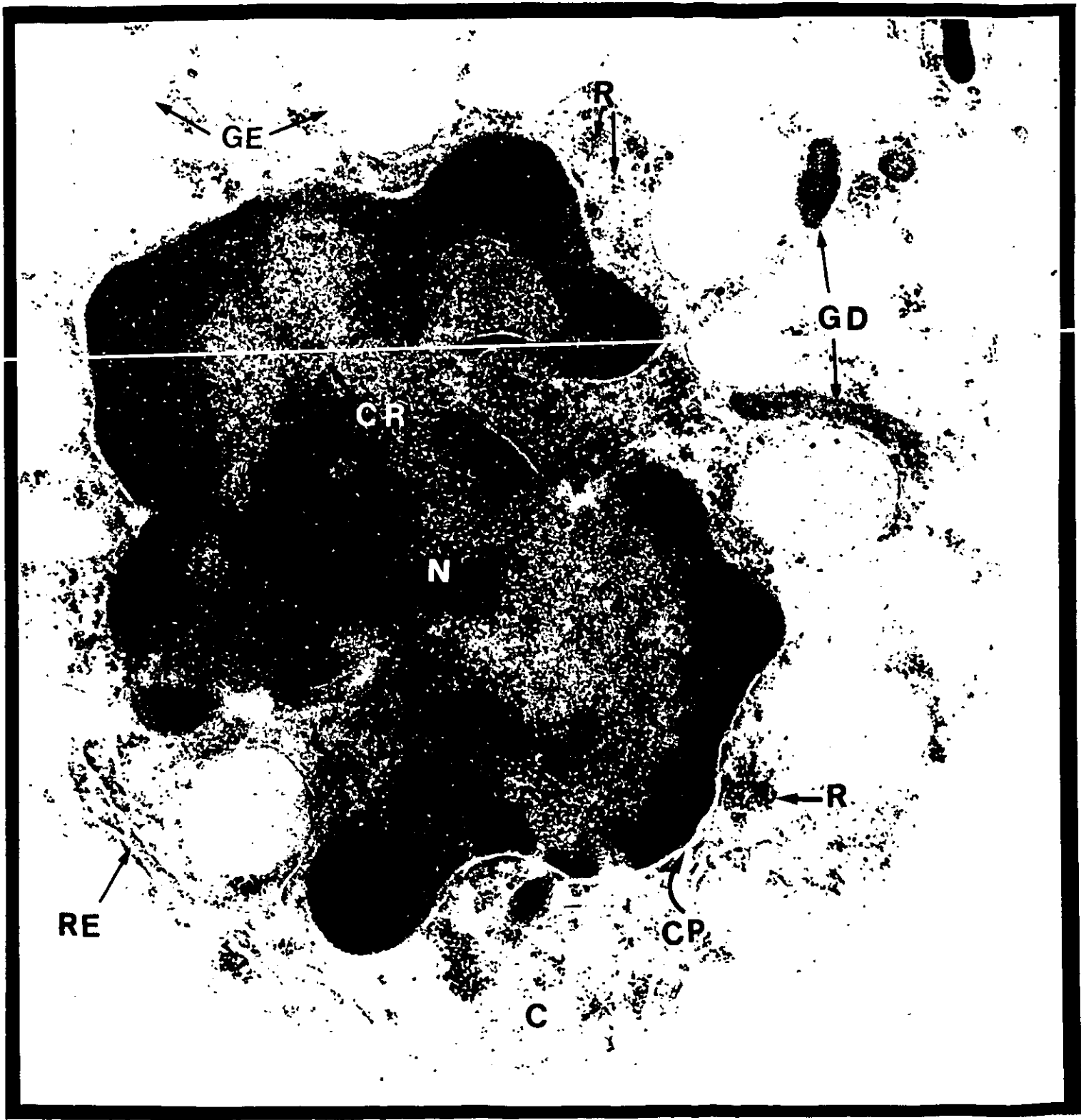


FIG. 16



## VI.2 Inmunocitoquímica. Identificación de la lectina en los hemocitos.

Con la metodología empleada se logró detectar la presencia de la lectina en los tres grupos celulares descritos previamente, tanto en la membrana como en gránulos del citoplasma. En estos ensayos se observa adecuada conservación de la ultraestructura celular, a pesar de haber sido procesadas con una fijación suave para conservar los sitios de unión específicos de la lectina con los anticuerpos, se logró observar en el citoplasma la presencia de organelos como mitocondrias, gránulos, retículo endoplásmico y en núcleo cromatina laxa y compacta, así como la cisterna perinuclear (Tabla III). A continuación se describen las características y la presencia de lectina de cada tipo celular citadas en este trabajo.

1) Los hemocitos pequeños redondos presentaron poca interacción con los anticuerpos anti-lectina, tanto en membrana como en gránulos, por lo que se deduce que en estos se encuentra menor cantidad de lectina (Fig. 17).

2) Los hemocitos fusiformes: presentan una reacción positiva y abundante marca, tanto en membrana como en gránulos, lo cual nos indica que este hemocito presenta mayor concentración de lectina de acuerdo con la (Fig. 18).

3) El Hemocito grande granular (Fig. 20). La marca en gránulos y membranas se aprecia abundante como en los fusiformes, una observación particular es la abundante marca que se puede apreciar en el pseudópodo de un hemocito grande granular (Fig. 21).

De los anticuerpos que se utilizaron para este estudio, con el que se obtuvo un buen resultado fue el policlonal de conejo anti-lectina 1:100 (Fig. 18) siendo el

resultado mas satisfactorio en la dilución 1:200 con el mismo anticuerpo (Fig. 19). Se utilizó como segundo anticuerpo para este ensayo GAR-15 en dilución 1:40. (Fig. 12-16).

En la aplicación del complejo streptavidina-oro contra el anticuerpo primario marcado con biotina, el marcaje es positivo en los gránulos, sin embargo no se detectó en la membrana citoplásmica, probablemente debido a la baja dilución de los anticuerpos (Fig. 22 y 23).

ANTICUERPO	DILUCION DEL ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCION DEL ANTICUERPO SECUNDARIO	MARCA EN HEMOCITO PEQUEÑO OVOIDE	MARCA EN HEMOCITO FUSIFORME	MARCA EN HEMOCITO GRANDE GRANULAR
I MONOCLONAL SIN BIOTINA	ANTILECTINA (RATON) 1:100	IgG 10 nm 1:40	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
II POLICLONAL SIN BIOTINA 1:100 1:200	ANTILECTINA (CONEJO) 1:100	GAR 15 nm 1:40.	EN CITOPLASMA Y GRANULOS ESCASA (Fig. 17-1:100)	EN CITOPLASMA Y GRANULOS ABUNDANTE (Fig. 18-1:100) (Fig. 19-1:200)	EN CITOPLASMA Y GRANULOS ABUNDANTE (Fig. 21-1:100) (Fig. 20-1:200)
CONTROL SIN BIOTINA	-----	IgG -- GAR 1:40.	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
III MONOCLONAL CON BIOTINA	ANTILECTINA (RATON) 1:120	STREPTAVIDINA ORO 20nm 1:80	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
IV POLICLONAL CON BIOTINA	ANTILECTINA (CONEJO) 1:120.	STREPTAVIDINA ORO 20nm 1:80.	NEGATIVO	ESCASA (Fig.22)	ESCASA (Fig.23) EN GRANULOS
V CONTROL CON BIOTINA	-----	STREPTAVIDINA ORO 20nm 1:80	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

**TABLA III.** Resultados de la localización de la lectina en los hemocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*. El resultado más satisfactorio se observó en la dilución 1:200 del anticuerpo policlonal sin biotina. Por este procedimiento se logró conservar características estructurales de las células, a pesar de haberse aplicado una fijación suave se observan: el núcleo, cisterna perinuclear, mitocondrias y gránulos de diferentes tamaño. (Figs. 17 a 23)

**FIG. 17.** Localización de la lectina en hemocito pequeño ovoide del langostino *Macrobrachium rosenbergii*. Se utilizaron anticuerpos antilectina sin biotina en dilución **1:100** y como segundo anticuerpo Gar 1:40 marcado con oro coloidal de 15 nm. La lectina se encuentra preferentemente en gránulos y hacia la membrana citoplásmica. En estos hemocitos la marca ( L ) es menor que en los otros dos tipos de hemocitos por lo que se deduce que la lectina se encuentra presente en menor cantidad. También se puede observar que la ultraestructura se conservó bastante bien a pesar de la fijación suave, por lo que podemos distinguir el núcleo (N), cromatina (CR), cisterna perinuclear (CP), citoplasma ( C ) y gránulos citoplásmicos ( G ). A) 40,000X y B) 60,000X.

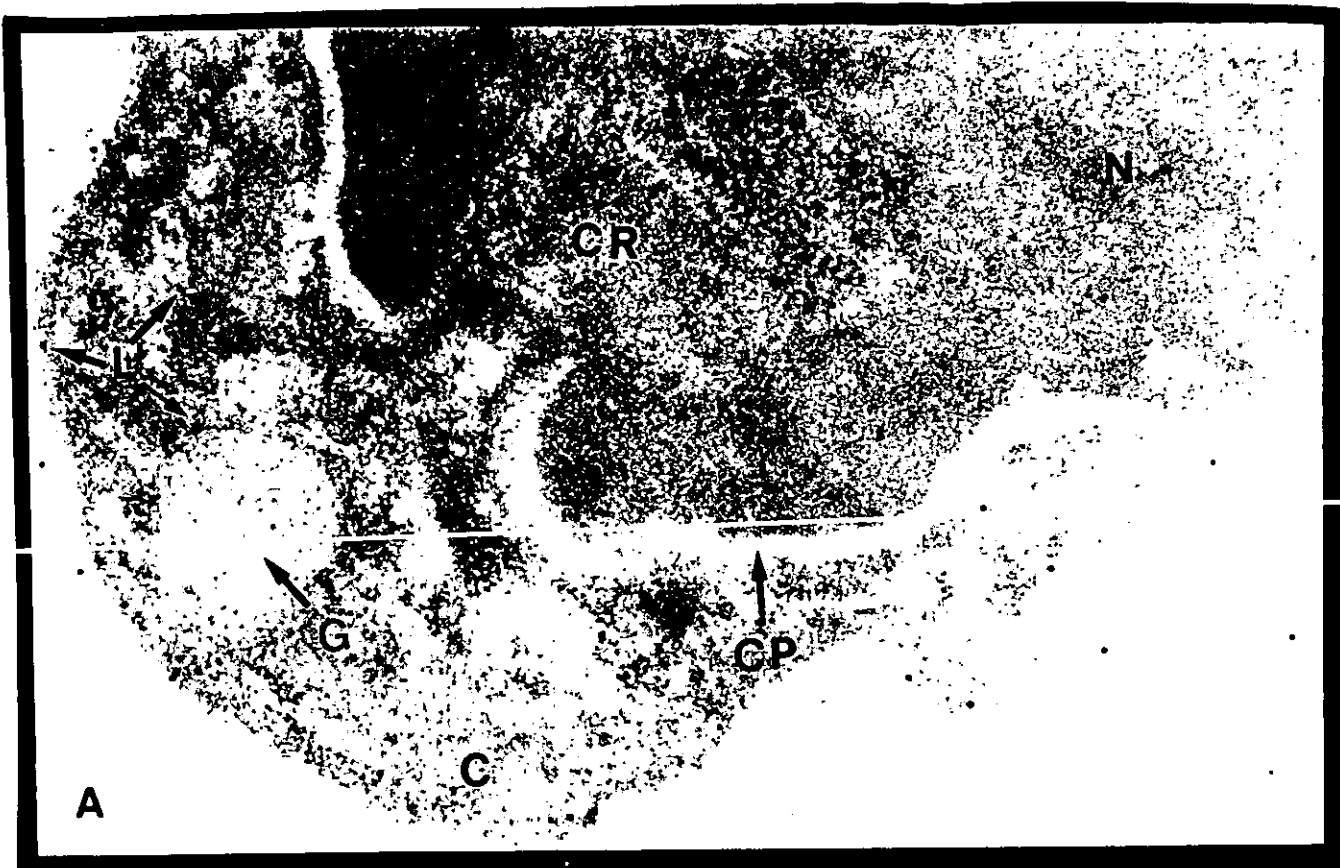


FIG.17

**FIG. 18.** Inmunolocalización de la lectina en hemocitos fusiformes del langostino *M. rosenbergii*. Se aprecia que la marca (L) es mucho más abundante que en los hemocitos pequeños, la conservación de la ultraestructura es aceptable. La preferencia de la marca es en los gránulos citoplásmicos y hacia la membrana. Se utilizaron anticuerpos antilectina sin biotina 1:100 y GAR 1:40 de 15 nm. La fijación fue suave y se contrastó con uranilo-plomo. Se aprecia el núcleo (N), cromatina (CR), cisterna perinuclear (CP), gránulos citoplásmicos (G) y mitocondrias (M). 36,000X.



FIG.18

**FIG. 19.** Localización de la lectina (L) en células fusiformes del *M. rosenbergii*. En esta fotografía apreciamos las características muy similares a las de la Fig. 18. La diferencia radica en que la dilución del anticuerpo antilectina es de **1:200** y resulta ser mas adecuada. Podemos observar el núcleo (N), la cisterna perinuclear (CP), la cromatina (CR) y los gránulos citoplásmicos (G) de diferentes formas. 31,250X.





FIG.19

**FIG. 20.** Localización de la lectina (L) en el hemocito grande granular de *M. rosenbergii*. La conservación de la ultraestructura presenta las características como en las otras células tratadas para inmunolocalización. La dilución del anticuerpo antilectina es de **1:200** y el GAR de 1:40. La marca se aprecia en gránulos y hacia la membrana citoplásmica. Se observa el núcleo (N), cisterna perinuclear (CP), cromatina (CR) y gránulos citoplásmicos (G) de diferentes formas. 31,250X.



FIG. 20

**FIG. 21.** Pseudópodo de un hemocito grande granular del langostino *M. rosenbergii*. Observamos que la marca (L) es abundante, en gránulos y hacia la membrana citoplásmica. Los anticuerpos aplicados fueron antilectina 1:100 y GAR 1:40. Se observan gránulos citoplásmicos (G) de diferentes tamaños. 64,000X.



FIG. 21

**FIG. 22** Hemocito fusiforme y **23** hemocito grande granular. Localización de la lectina (L) utilizando anticuerpos antilectina marcados con biotina. Para localizar el primer anticuerpo se aplicó un complejo streptoavidina oro 20 nm. El marcaje (L) es escaso debido probablemente a la dilución de los anticuerpos, sin embargo la marca se encontró presente principalmente en los gránulos citoplásmicos. La conservación de la ultraestructura muestra el núcleo (N), la cromatina (CR), la cisterna perinuclear (CP) y en el citoplasma se encuentran mitocondrias (M) y gránulos (G) de diferentes formas. El contraste se llevó a cabo con acetato de uranilo y citrato de plomo. 22) 44,000X y 23) 26,250X.

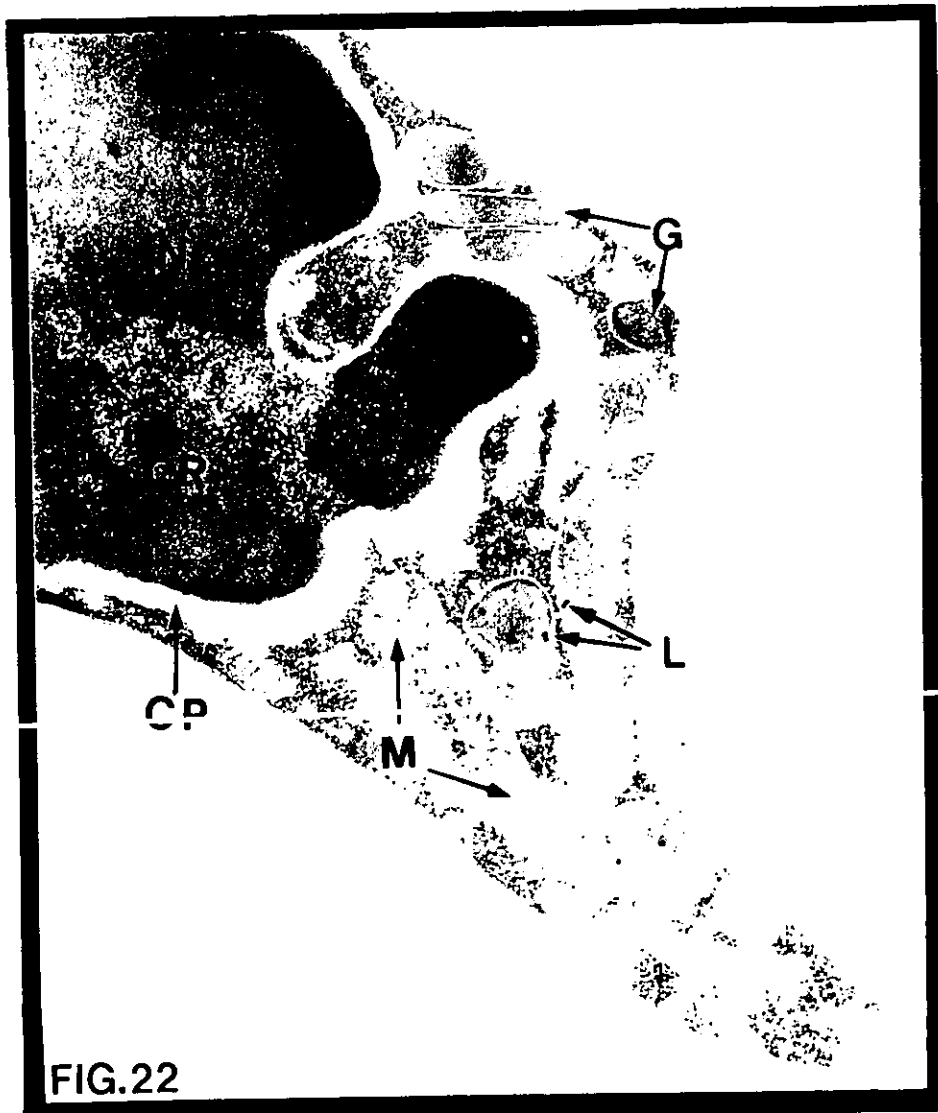


FIG.22



FIG.23

## VII: DISCUSION

La clasificación de los hemocitos circulantes en los invertebrados resulta difícil porque cada especie posee grupos celulares con características particulares, por esta razón, consideramos importante establecer las características morfológicas de los hemocitos del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, como un organismo representativo de los crustáceos de agua dulce. En los invertebrados y particularmente en los decápodos, los hemocitos se han clasificado con base en la presencia o ausencia de gránulos (12, 35, 45), clasificándose: en hemocitos granulares y hemocitos no granulares, también llamados hialinos.

En este trabajo identificamos las tres poblaciones principales de hemocitos en la hemolinfa del langostino. Esta clasificación fue factible debido a que los procesos que se establecieron para la obtención y fijación de las células nos permitieron conservar las características celulares. Nuestros resultados nos permitieron confirmar también la propuesta previa a la clasificación de estas células en tres grupos principales: los pequeños ovoides, los fusiformes y los grandes granulares (37, 38).

Para la clasificación de los hemocitos del langostino fueron considerados algunos de los aspectos que se han estimado en los invertebrados (12, 35), los cuales se basan en la presencia o ausencia de gránulos. Los hemocitos fusiformes identificados en el langostino comparten las características con las células hialinas de la langosta roja *Panulirus interruptus* (12), para el camarón tigre *Penaeus japonicus*, se emplea el término "hemocitos indiferenciados" por no tener las



características bien definidas e incluso presentar escasos gránulos citoplásmicos, los cuales también son identificados en *M. rosenbergii* (46).

Por la variabilidad que existe tanto en el tamaño como en el número de gránulos en los hemocitos granulares de los crustáceos (44), se ha propuesto la hipótesis de la existencia en una sola línea celular, que comprende desde células agranulares a células con gránulos grandes, y por lo tanto, sus características morfológicas dependen del estado de maduración celular. Esta propuesta es adecuada en el tipo de hemocitos grandes granulares del langostino *M. rosenbergii*, que presentan características que permiten suponer que se encuentran en diferentes estadios de maduración. Así se ha identificado que estos hemocitos poseen características que han permitido subdividir a esta población en dos subtipos: el subtipo I, que son de menor tamaño y con menor número de gránulos que los del subtipo II, los cuales contienen un gran número de gránulos pleomórficos y electrodensos (37).

La población celular de hemocitos fusiformes, se ha considerado en algunas especies como células indiferenciadas, por tratarse de células pequeñas que carecen de organelos citoplasmáticos. Otros grupos celulares semejantes han sido identificados en el camarón tigre *Penaeus japonicus*, aunque en esta especie dichas células parecen tener actividad fagocítica (46).

Mediante microscopía electrónica de transmisión, se determinó por inmunolocalización la presencia de lectina, tanto en la membrana de los hemocitos como en los gránulos presentes en los tres tipos de células: hemocitos pequeños redondos, hemocitos fusiformes y en los grandes granulares.

La presencia de lectina en los gránulos, ha sugerido que el inducir la degranulación de los hemocitos, se logra la liberación de proteínas con actividad aglutinante (43). Por fluorescencia se ha detectado la presencia de lectina en membrana y citoplasma de granulocitos en insectos (53). Estudios realizados en hemocitos granulares del gusano de la remolacha *Spodoptera exigua* (52) y en *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata) (42), coinciden con nuestros resultados en la localización de la lectina en los gránulos y la membrana celular. Sin embargo, también identificamos la presencia de la lectina en los hemocitos pequeños ovoides pero con un marcaje menor en comparación con los hemocitos fusiformes y los grandes granulares, por lo cual se puede sugerir que en cada tipo de hemocito la lectina podría tener una actividad diferente.

Los estudios por hemaglutinación e inmunofluorescencia realizados en la ostra *Crassostrea virginica* (49 y 50) y en el mejillón *Mytilus edulis* (51) se detectó a la lectina en los hemocitos por medio de anticuerpos elaborados contra la lectina sérica. Resultados similares obtuvimos en la localización de la lectina realizada en los hemocitos del langostino *M. rosenbergii*, por lo cual podemos deducir que existe una relación entre la lectina sérica y la lectina que se encuentra presente en la membrana y en los gránulos citoplásmicos de estas células. En los ensayos comparativos mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-lectina sérica, se logró identificar que el anticuerpo policlonal define una clara interacción con la lectina de la membrana celular y los gránulos de los hemocitos, esto nos sugiere que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal es mas específico y que se puede encontrar de manera menos accesible en la célula que

cuando la lectina se encuentra en la circulación.

La presencia de la lectina en estudios previos de citoquímica realizados por microscopía óptica, sugieren que los hemocitos granulares presentan una mayor capacidad para ser reconocidos por los anticuerpos contra la lectina sérica. Esto resulta de gran interés debido a que las células poseen actividad fagocítica (37), sin embargo de acuerdo a los resultados de inmunolocalización se aprecia, que la lectina se encuentra también en la membrana en estos grupos celulares, aunque en parte se descarta la posibilidad de considerar a la lectina de membrana como un marcador fenotípico de una población celular; por lo tanto, al identificar que es en los gránulos donde se encuentran un mayor marcaje de lectina lo que sugiere que los diferentes grupos celulares secretan a esta proteína, posiblemente como una respuesta a la presencia de agentes patógenos.

La utilización de anticuerpos primarios monoclonales y policlonales con y sin marca de biotina específicamente contra la lectina, favoreció la realización de este estudio. Los resultados en general son satisfactorios ya que logramos identificar la ultraestructura de los diferentes tipos hemocitos estudiados y, se comprobó la presencia de lectina en las células de la hemolinfa de el langostino.

Consideramos que para la clasificación de los hemocitos es necesario relacionar los factores fisiológicos de cada especie de invertebrados, como por ejemplo, el estadio de desarrollo y el grado de maduración gonádica (13), o bien buscar marcadores fenotípicos que nos permitan tener parámetros acerca de las características propias de cada grupo celular para identificar su función.

Está claro que este es un campo abierto para futuras investigaciones, en

particular la importancia del langostino con respecto a la resistencia a enfermedades, considerando su relevancia económica y nutricional. Otro aspecto relevante es la utilización de las lectinas de este tipo de estudios, así como su aplicación como un reactivo biológico de importancia en la medicina y en la biología.

## VIII CONCLUSIONES

- Se logró identificar los tres grupos celulares presentes en la hemolinfa del langostino *Macrobrachium rosenbergii* con la metodología empleada, así como una adecuada conservación a nivel ultraestructural, lo cual es de utilidad para tener la referencia de las células en el estudio de inmunolocalización.

- Se comprobó que la lectina se encuentra presente en los tres tipos de hemocitos, tanto en gránulos como en membrana citoplásmica, encontrándose en menor cantidad en los hemocitos pequeños ovoides, más abundante en los fusiformes, y en los grandes granulares, lo que permite sugerir que cada grupo celular tiene diferente función.

- El resultado mas aceptable en la utilización de los anticuerpos para la localización de la lectina fue el policlonal antilectina sin biotina en dilución 1:200.

- Al encontrarse la lectina presente en los hemocitos, existe la posibilidad de que la síntesis de esta proteína se lleve a cabo en los hemocitos circulantes los cuales puede participar en el mecanismo de defensa de este crustáceo.

De acuerdo a los parámetros que se han utilizado para clasificar los diferentes tipos de hemocitos en los invertebrados, se sugiere investigar las características particulares de cada grupo celular como son marcadores fenotípicos y actividad biológica.

Se puede considerar que la lectina sérica tiene una estrecha relación con la lectina presente en los gránulos y membrana citoplásmica de los hemocitos.

## IX APENDICE. PREPARACION DE SOLUCIONES

I.1 Jeringa de 5 ml. con aguja ultrafina 21 x 32 mm.

I.2 Mezcla anticoagulante-fijador para ultraestructura.

2 ml. anticoagulante de citrato de sodio 3.8% en solución salina 0.9%, pH5

2 ml. fijador.- glutaraldehído al 1.5% (1.8 ml. de solución al 70% de glutaraldehído) en 10 ml de PBS

I.3 PBS. Buffer de fosfatos, pH 7.3, en 500 ml. de agua desionizada.

- NaCl ----- 2.92 gr.

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>----- 0.68 gr.

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O ----- 9.00 gr.

I.4 Tetraóxido de Osmio: 1 gr en 50 ml. de agua desionizada, para hacer una dilución

final al 1%.

I.5 Deshidratación. Alcohol etanol al 100%.

30% ----- 70 ml. de agua desionizada - 30 ml. alcohol

50% ----- 50 ml. de agua desionizada - 50 ml. alcohol

70% ----- 30 ml. de agua desionizada - 70 ml. alcohol

80% ----- 20 ml. de agua desionizada - 80 ml. alcohol

96% ----- 4 ml. de agua desionizada - 96 ml. alcohol

I.6 Acetato de uranilo 3%.

300 mg. de acetato de uranilo en 10 ml. de agua desionizada.

I.7 Citrato de plomo 0.3%.

30 mg de Citrato de plomo en 10 ml. de agua desionizada.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### 1.8 Anticoagulante-Fijador.

2 ml. Anticoagulante de citrato de sodio 3.8% en solución salina 0.9%.

2 ml. Mezcla de fijador. Paraformaldehído al 4% - Glutaraldehído 0.25%.

En 10 ml. de PBS se disuelve por calentamiento (sin hervir) 0.4 gr. de paraformaldehído, se deja enfriar y posteriormente se añaden 0.0357 ml. de glutaraldehído. Para la extracción de la hemolinfa se preparó el paraformaldehído al 9% y el glutaraldehído al 0.5% ya que se realiza una solución con el anticoagulante.

## X LITERATURA CITADA

1. Bautista, C. 1988. Crustáceos. Tecnología de cultivo. Edit. Mundi-Prensa, Madrid, España. 93-126.
2. Brock, J.A. 1993. A synopsis of pathology diseases and production problems of cultured *Macrobrachium*, with an emphasis on experiences in Hawaiian prawn farming. CRC Hand book of Mariculture. 2nd ed. vol. 1. Edited by McVey, J.P. Maryland, USA. 361-391.
3. Burnet, F.M. 1974. Invertebrate precursors to immune responses. Comp. Top. Immunobiol. 4:13-24.
4. Parish, C.R. 1977. Simple model for self-non-self discrimination in invertebrates. Nature. 267:711-713.
5. Söderhäll, K. 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization. A recognition mechanism of arthropods. A review. Dev. Comp. Immunol. 6:601-611.
6. 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 cooperation in the defense reactions of arthropods. Cell Tissue Res. 245:43-49.
7. Bayne, C.J. 1990. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. Bioscience. 40 (10):723-731.
8. Söderhäll, K.A. Vey and M. Ramstedt. 1984. Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. Dev. Comp. Immunol. 8:23-29
9. Persson, M., A. Vey. and K. Soderhall. 1987. Encapsulation of foreign particles *in*



- vitro* by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. Cell. Tissue Res. 247:409-415.
10. Boucias, D.G., S.Y. Hung, I. Mazet and J. Azbell. 1994. Effect of the fungal pathogen, *Beauveria bassina*, on the lysozyme activity in *Spodoptera exigua* larvae. J. Insect. Physiol. 40(5):385-391.
  11. 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.
  12. 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.
  13. Renwranz, L. 1986. Lectins in mollusc and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. Symp. Zool. Soc. Lond. 56:81-93.
  14. Vasta, G.R. 1992. Invertebrate lectins, distribution, synthesis, molecular biology and function. In: Glycoconjugates: Edited by Howard J. Allen and Kisailus. Buffalo, New York. pp.. 593-634.
  15. Du pasquier, L. 1989. Evolution of the immune system. In: Fundamental Immunology: Edited by William E. Paul. Second Edition. Raven Press Ltd. pp. 139-165.
  16. Van de Vyver, G., S. Holvoet and P. Dewint. 1990. Variability of the immune response in freshwater sponges. J. Exp. Zool. 254:215-227.
  17. Duwel-Eby, L.E., D. Karp. 1990. The inducible humoral immune response to soluble proteins in the American Cockroach. Defense Molecules. 63-78.
  18. Hilgard, H.R., R.H. Wander, W.E. Hinds. 1974. Specific receptors in relation to

evolution of immunity. Contemp. Top. Immunobiol 4:151.

19. Hildemann, W.H, E.A.Clark, R.L. Raison. 1981. Phylogeny of Immunocompetence. In "Comprehensive immunogenetics". New York: Elsevier. 302-354.
20. Boman, H.G, I. Nilsson-Faye, K. Paul, T. Rasmuson. 1974. Insect Immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in the hemolymph of *Samia cynthia* pupae. Infect Imm 10:136.
21. Boman, H. G., D. Hultmark. 1987. Cell-free immunity in insects. Ann Rev Microbiol. 41:103.
22. Boman, H.G. 1982. Humoral immunity in insects and the counter defense of some pathogens. Fortsch Zool 27:211.
23. Vasta, G.R., T. C. Cheng, J.J. Marchalonis. (1984). A lectin on the hemocyte membrane of the oyster (*Crassostrea virginica*). Cell. Immunol, 8:475-485.
24. Drickamer, K. 1993. Recognition of complex carbohydrates by Ca dependent animal lectins. Biochem. Soc. Trans. 21:456-459.
25. Amirante, G.A. 1992. Probable role of induced lectins in capsule formation in *Squilla mantis* L. Boll. Zool. 59:153-158.
26. Bozola, J.J.and D.R. Lonnie. (1991). Electron Microscopy. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Cap. 9. 236-251.
27. Retegui, L. A. 1992. Los monoclonales o como fabricar anticuerpos a medida. Ciencia Hoy. Fondo de Cultura Económica. 9-68.
28. Polak, J.M. and M. Varndell Ian. 1984. Immunolabeling for Electron Microscopy. Elsevier Science Publishers B.V.

29. Brock, J.A. 1993. A synopsis of pathology, diseases and production problems of cultured of *Macrobrachium* , with an emphasis on experiences in Hawaiian prawn farming. CRC Handbook of Mariculture. 2nd ed. vol. 1. Edited by McVey, J.P. Maryland, USA. 361-391.
30. Ratcliffe, N.A. 1989. The biological significance of immunity. Dev. Comp. Immunol. 13:273-283.
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 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. 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. Lanz H., V. Tsutsumi and H. Arechiga. 1993. Morphological and biochemical characterization of *Procambarus clarkii* blood cells. Dev. Comp. Immunol. 17:389-397.
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. Vázquez, L. 1996. Estudio sobre los mecanismos de inmunidad en el

- langostino malayo *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan). Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas (Inmunología). UNAM.
38. Vázquez, L., A. Pérez-Torres, D. Millán, C. Agundis, E. Cooper, G. Martín, E. Zenteno. 1997. Morphology of hemocytes from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. (En prensa).
  39. Witt, M. and K. Reutter. 1990. Electron Microscopic demonstration of lectin binding sites in the taste buds of the European catfish *Silurus glanis* (Teleostei). Histochemistry. 94:617-628.
  40. Pipe, R.K. 1990. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Cell and Tissue Research. 261:261-168.
  41. Alroy, J., A.A. Ucci, M.E.A and Pereira. 1984. Lectins: Histochemical probes for specific carbohydrate residues. Advances in Immunohistochemistry. R.A DeLellis, Masson Inc. N.Y. 67-88.
  42. Kuhn, K.H, Uhler J. and Grubhoffer L. 1996. Ultrastructural localization of asialic acid specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata). Parasitol Res. 82:215-221.
  43. Okino, N., S. Kawabata, T. Saito, M. Hirata, T. Takagi and S. Iwanaga . 1995. Purification, characterization, and cDNA cloning of a 27-kDa lectin (L 10) from horseshoe crab hemocytes. J Biol Chem. 270:31008-31015.
  44. Mix, M.C. and A.K. Sparks. 1980. Hemocytes classification and differential counts in the dungeness crab, *Cancer magister*. J. Comp. Pathol. 141B:477-485.
  45. Gary G.M. and B.L. Graves. 1985. Fine Structure and Classification of Shrimp

- hemocytes. Journal of Morphology. 185:339-348.
46. Tsing, A., J.M. Arcier and M. Brehélin. 1989. Hemocytes of penaeid and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. J. Invertebr. Pathol. 53:64-77.
  47. New, M.B. y S. Singholka. 1984. Cultivo de camarón de agua dulce. Manual para el cultivo de *Macrobrachium rosenbergii*. FAO. Doc. Téc. Pesca. 225:118.
  48. Vázquez, L., L. Montañó, F. Massó, and E. Zenteno. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea Decapoda) hemolymph. Comp. Biochem. Physiol. 105B: 617-623.
  49. Renwants, L. and A.J. Stahmer. 1983. Comp. Physiol. 149, 535.
  50. Vasta, G.R., J.T. Sullivan, T.C. Cheng, J. J. Marchalonis and G. W. Warr. 1982. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. Journal of Invertebr. Pathol. 40:367-377.
  51. Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1993. The galactosa binding lectin from the beet armyworm. *Spodoptera exigua*: Distribution and site of synthesis. Insect. Biochem. Molec. Biol. Vol. 23 (2):233-242.
  52. Amirante, G. 1986. Recettori di membrana e riconoscimento cellulare. Cultura scuola. Istituto de la Enciclopedia Italiana.