



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA EN RATO-
NES POR EXTRACTOS DE Phaseolus coccineus
y Phaseolus vulgaris

T E S I S

Que para obtener el título de
Q. F. B.

Orientación Bioquímico-Microbiólogo

p r e s e n t a :

MARIA RAQUEL ALICIA CALDERON TINOCO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AS Tesis 1977
ABO M-1263
FECHA _____
PROC _____
S _____



QUIN 01

Jurado asignado originalmente según el tema:

PRESIDENTE	Magdalena Acosta Segura
VOCAL	Salvador Martín Sosa
SECRETARIO	Librado Ortíz Ortíz
1er. SUPLENTE	Victoria Valles Sánchez
2o. SUPLENTE	Magdalena Oliva Mejía

Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Biología Experimental,
Facultad de Medicina,
U. N. A. M.

Sustentante:

Ma. Raquel Alicia Calderón Tinoco _____

Asesor del tema:

Magdalena Acosta Segura _____

Supervisor Técnico:

Félix Córdoba Alva _____

INDICE

	Pág.
Capítulo I Introducción	1
Capítulo II Materiales y Métodos	4
Capítulo III Resultados	12
Capítulo IV Discusión	35
Capítulo V Conclusiones	39
Referencias	41

INDICE DE FIGURAS Y DE TABLAS

	Pág.
Figura	
1	18
2	19
3	21
4	24
5	25
6	27
7	30
8	31
9	31
Tabla	
1	13
2	14
3	15
4	16
5	22
6	28
7	34

Con cariño para mis papás

Con cariño y respeto al Dr. Félix Córdoba A.,
por la valiosa ayuda y orientación que me
brindó durante mi carrera y para la elaboración
de este trabajo.

CAPITULO I

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las lectinas son proteínas que tienen la propiedad de aglutinar eritrocitos y otras células. Estas sustancias se encuentran presentes en plantas y animales. Las semillas de numerosos vegetales constituyen la fuente principal de obtención de las lectinas aunque también se obtienen de algunos invertebrados (caracol) y de peces. A las aglutininas de plantas comúnmente se les denomina fitohemaglutininas. Sin embargo, como también están presentes en otros organismos, Boyd (1) propuso el término "Lectina" (del latín *Lagere*, elegir) enfatizando la especificidad de estas sustancias independientemente de su origen vegetal o animal. Algunos ejemplos de lectinas importantes son: la Concanavalina A (Con A) de *Canavalia ensiformis* (Jack bean), la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (frijol rojo), la de frijol de soya (*Glycine max*) y la de semilla de lenteja (*Lens culinaris*).

Las lectinas presentan diferentes propiedades químicas y biológicas. Entre estas la de unirse específicamente a polisacáridos y glicoproteínas; se emplea para el aislamiento y purificación de carbohidratos y el estudio de la química de las mismas. Esta propiedad singular ha permitido además, desarrollar técnicas de cromatografía de afinidad para la purificación de las lectinas mismas.

Las lectinas también activan *in vitro* la mitosis en ciertas poblaciones de linfocitos, por lo que actualmente se usan para estudiar la bioquímica y morfología celular resul-

tado de tal estimulación (2). Debido a la semejanza que tiene el fenómeno de la interacción de las lectinas con los linfocitos, al observado con antígenos, se usan las lectinas para el estudio de estos fenómenos celulares. Así por ejemplo, la estimulación antigénica de células normales *in vitro* da lugar a la activación de una pequeña población de linfocitos, mientras que la estimulación con lectinas activa un número mayor de células, facilitando el estudio bioquímico y molecular de los linfocitos. Después de la activación se encuentra un aumento en la síntesis de DNA, de RNA y de proteínas (3), una diferenciación o transformación blastoide (4), y la producción en los cultivos de sustancias solubles como es el factor inhibidor de la migración (5), el factor reactivo de la piel (6) y los factores supresores (7).

La Con A es la lectina mejor estudiada (8), se une específicamente a azúcares como α -D-manopiranososa, α -D-glucopiranososa y fructofuranosa. Aparece en forma de monómero, dímero o tetramero dependiendo del pH y las condiciones iónicas; el monómero tiene un peso molecular de 25,000, un sitio de unión para el azúcar, uno para un ion Ca^{++} y otro para un metal de transición. El metal de transición que puede ser Mn^{++} o Zn^{++} , es necesario para la unión del ion Ca^{++} y ambos cationes se requieren para la unión con el azúcar. Activa selectivamente *in vitro* linfocitos derivados del timo (linfocitos T) (4). Los linfocitos originados en la médula ósea (linfocitos B) no se activan por la Con A a menos que se encuentre en forma insoluble (9).

Muchos de los estudios con lectinas mencionados se han efectuado en sistemas de cultivo de células pero se han hecho menos investigaciones del efecto de estas sustancias en animales vivos. Por ejemplo, Nirmul y col. (10) publicaron que la Con A ejerce un efecto inmunosupresor en los ratones. Ellos encontraron una reducción significativa del rechazo de aloinjerto de piel cuando trataron a los ratones con una dosis alta de Con A por vía intravenosa, 2 días después del injerto. Sin embargo, no lograron demostrar este efecto supresor en los ratones estimulados con eritrocitos de carnero. Por otro lado, Egan (11) describió un efecto supresor de la respuesta inmune humoral hacia eritrocitos de carnero en ratones tratados con Con A. Así mismo, la fitohemaglutinina (PHA) de frijoles rojos también parece ser una buena sustancia para suprimir la respuesta inmune primaria que el ratón normalmente produce cuando es inyectado con eritrocitos de carnero (12).

Debido a los estudios anteriores y otros no mencionados en esta breve introducción nos pareció de interés investigar la presencia de lectinas en los frijoles mexicanos de tan amplio consumo popular en nuestro país, y en caso de obtenerlas, efectuar algunos experimentos tendientes a estudiar algunas de sus principales propiedades inmunológicas en los ratones. En este reporte, se presentan los estudios de aglutinación de eritrocitos por las lectinas, su efecto inmunosupresor y su actividad mitogénica en cultivos de linfocitos.

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1. Ratones

En este trabajo se usaron ratones de 25-30 g de la cepa CD-1, obtenidos de Charles River Laboratories, Boston, Mass. E.U. Esta cepa se propaga desde hace años en la granja de la Facultad de Medicina UNAM. También se emplearon ratones de la cepa A/St de West Seneca Laboratories, Buffalo, N.Y. E.U., de 8-10 semanas de edad.

2. Eritrocitos

La sangre de carnero se colectó directamente en solución de Alsever estéril (13). Se usó sangre humana A, B, O de donadores previamente tipificados; sangre de conejo y de ratón, que fueron obtenidas en solución salina 0.9% (p/v) oxalatada. El paquete de eritrocitos se obtuvo por centrifugación lavando 3 veces con un amortiguador de fosfatos salino 0.15 M pH 7.2 (PBS). Estos eritrocitos se emplearon para la hemaglutinación y la inmunización de los ratones.

3. Preparación de extractos de frijoles

Frijoles de 10 variedades fueron adquiridas en varias tiendas de la ciudad y clasificados en la Escuela de Graduados, Universidad de Agricultura de Chapingo, Edo. de México (Tabla 1). Los frijoles se molieron en un mortero hasta tener un polvo fino que se extrajo con 10 volúmenes de NaCl (0.9%) por peso de

frijol, a una temperatura de 4°C por 24 h. El material se centrifugó a 3000 x g durante 3 horas y posteriormente se determinó el contenido de proteína en el extracto obtenido por el método de Biuret (14). Estos extractos se emplearon para buscar un efecto aglutinante y como agente inmunosupresor *in vivo*. También para buscar actividad mitogénica *in vitro* sobre células. En algunos experimentos el extracto de frijol se calentó a ebullición en baño María por 30 minutos antes de probarse actividad inmunosupresora y hemaglutinación.

4. Fraccionamiento con sulfato de amonio

La purificación parcial de las lectinas del extracto salino de alubia y garbancillo, se llevó a cabo por precipitaciones consecutivas con solución saturada de sulfato de amonio, obteniendo fracciones de 20%, 33%, 50%, 66% y un sobrenadante final. Cada una de estas fracciones se disolvieron en el mínimo volumen de agua destilada, se dializaron contra PBS y contra agua bidestilada y desionizada. Finalmente las soluciones obtenidas fueron liofilizadas. Este polvo de material semipurificado se empleó también en los experimentos de mitogénesis celular.

5. Acoplamiento de proteínas a eritrocitos de carnero por el método de glutaraldehído

Para medir la respuesta humoral en el ratón contra albúmina de huevo (AH), albúmina sérica bovina (ASB) y gamma

globulina bovina (GGB) se acoplaron estos antígenos a eritrocitos de carnero por el método de glutaraldehído (15). Para AH y ASB se pesaron 20 mg de proteína, se disolvieron en 10 ml de PBS y se le adicionaron 0.4 ml del paquete de eritrocitos de carnero lavados 3 veces con PBS. La suspensión se agitó suavemente y se añadió 2 ml de glutaraldehído al 2.5% en solución acuosa; la agitación se continuó por 2 h a temperatura ambiente. Para GGB se usaron 12 mg de proteína, 0.4 ml de eritrocitos de carnero, 0.5 ml de glutaraldehído al 2.5% y se agitó por 1 h. En todos los casos el paquete de células sensibilizadas se lavó 3 veces con PBS y se ajustaron al 1% antes de usarse para la prueba de hemaglutinación en presencia de suero de ratón previamente inmunizado con cada uno de los antígenos.

6. Acoplamiento de proteínas a Sepharose 4-B por el método de BrCN

Para observar el efecto del extracto de alubia en la respuesta inmune del ratón hacia los antígenos anteriores, se acopló la proteína a Sepharose 4-B (Pharmacia, Piscataway, N.J.) por el método de BrCN (16), y se inmunizaron ratones con esta preparación. El acoplamiento se llevó a cabo así: a 10 ml de Sepharose lavada, se añadieron 10 ml de agua destilada y 20 ml de carbonato de sodio 1 M. Se mezcló, se adicionó 0.5 ml de una solución de BrCN (2 g de BrCN por ml de acetoni-trilo). Este paso se llevó a cabo dentro de una campana extractora, agitando durante 1 a 2 minutos. A continuación la

Sepharosa activada se lavó en un embudo con filtro de vidrio, usando las siguientes soluciones:

- a) 100 ml de NaHCO_3 0.1 M pH 9.5
- b) 100 ml de H_2O
- c) 100 ml de NaHCO_3 0.2 M pH 9.5

La pasta se pasó a un recipiente de plástico que contenía 10 ml de NaHCO_3 0.2 M pH 9.5 y la proteína por acoplar; la suspensión se dejó a 4°C por 20 h. Después del acoplamiento la Sepharose se lavó con:

- a) 100 ml de CH_3COONa 0.1 M pH 4.0
- b) 100 ml de NaHCO_3 0.1 M pH 10.0

Estas soluciones de lavado contenían NaCl 0.5 M. La determinación de la proteína que se acopló a la Sepharose se hizo por el método de Nessler (17).

7. Hemaglutinación

En un primer paso se buscó la aglutinación de eritrocitos adicionando directamente la solución de extractos de frijol. Se buscó aglutinación de eritrocitos humanos, de carnero, de conejo y de ratón. El extracto de frijol se ajustó a una concentración de 2 mg/ml de proteína, y se hicieron diluciones seriadas al doble en PBS en un volumen final de 0.05 ml. A cada solución se le adicionó 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos al 1% en PBS. La mezcla se agitó e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y 18 h a 4°C antes de hacer

la lectura. Esta técnica se empleó también para titular anticuerpos contra eritrocitos de carnero, en el suero de ratones inmunizados previamente.

Para determinar anticuerpos contra AH, ASB y GGB, se usaron los eritrocitos de carnero sensibilizados con antígeno por medio del glutaraldehído (hemaglutinación pasiva).

Todos los títulos de hemaglutinación están expresados como el Log_2 de la recíproca de la última dilución donde apareció aglutinación.

8. Diseño experimental

Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) el primer día con 0.1 ml de diversas concentraciones del extracto de frijol. Se inmunizaron i.p. el tercer día con 0.1 ml de eritrocitos de carnero (2×10^8 células) y se sangraron del plexo retrobital con pipeta capilar el octavo día (5 días después del antígeno). Los sueros obtenidos fueron de-complementados a 56°C por 30 min y titulados individualmente antes de 24 h, empleando la técnica de microhemaglutinación descrita anteriormente.

En algunos experimentos se hicieron las siguientes modificaciones:

a) El extracto de frijol se administró varios días antes o después de la inmunización con eritrocitos de carnero.

b) Los ratones se trataron con una sola inyección de 500 μg del extracto de alubia y después de la inmunización con eritrocitos de carnero fueron sangrados a partir del día 2

hasta 50 días posteriores al estímulo antigénico.

c) Se estudió el efecto del extracto de alubia y garbancillo en la respuesta inmune secundaria, administrando la lectina 2 días antes de la primera y/o la segunda inmunización con eritrocitos de carnero.

d) Se cambió la vía de entrada del extracto de frijol y el antígeno, y el intervalo entre la administración de ambos.

e) En otro grupo de ratones se determinó el efecto del extracto de alubia, en la respuesta inmune contra la albúmina de huevo, albúmina sérica bovina y gamma globulina bovina.

9. Cultivo de timocitos y células de bazo

Con el propósito de saber si las lectinas de los extractos de alubia y garbancillo tenían efecto mitogénico, se probó su actividad en la proliferación de los linfocitos del bazo y timo de ratones.

La suspensión de timocitos y células de bazo de ratones A/St fueron ajustados a una concentración de 5×10^6 y 1.5×10^6 células por ml respectivamente en medio de cultivo RPMI-1640 con suero fetal de ternera al 5%, enriquecido con 0.5 mM de piruvato de sodio, 2 mM de L-glutamina, 1% de bicarbonato de sodio, 50 U de penicilina y 50 μ g de estreptomina. Las células se cultivaron en tubos de 12 x 75 mm (Falcon Plastics, catálogo # 2045, Los Angeles, Cal.) durante 72 h a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ en aire, 12 h antes de terminar el cultivo recibieron 1 μ Ci de timidina tri-

tiada (2 Ci/mM, New England Nuclear Company, Boston, Mass.). Posteriormente las células fueron precipitadas con 5% de TCA y colectadas en filtros de fibra de vidrio por medio de un filtrador múltiple. La radiactividad se midió en un contador beta de centelleo.

La base del experimento consiste en evaluar la incorporación de timidina tritiada al cultivo de células en un medio conteniendo diversas cantidades de los mitógenos usados: Con A, lipopolisacárido, extracto de alubia o garbancillo. Todos los resultados representan la media de 3 cultivos expresados como cuentas por minuto (cpm).

10. Tratamiento de células de bazo con suero anti-teta

Con el objeto de eliminar selectivamente las células derivadas de timo (linfocitos T) presentes en el bazo, se trataron 1×10^8 células de bazo de ratones A/St con 5 ml de suero normal o anti θ (1:10) y fueron incubadas 30 min a 4°C. Las células se lavaron 3 veces por centrifugación a 1000 rpm con 40 ml de medio, y se incubaron en complemento de cobayo al 2% (absorbido previamente con células de bazo para eliminar efectos citotóxicos inespecíficos). Luego se lavaron otras 2 veces y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI-1640 con 5% de suero fetal y se trataron como se describió anteriormente. Se determinó el número de células viables por el método de la exclusión del azul tripano (18). La viabilidad fue de 90% para las células normales y 88% para las tratadas con anti θ .

11.- Estadística

Los datos de inmunosupresión y mitosis se trataron estadísticamente usando una calculadora Hewlett-Packard Serie 9800 programada para "t" de Student.

CAPITULO III

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Actividad hemaglutinante

En las tablas 2 y 3 se muestran los resultados del efecto hemaglutinante producido por los 10 extractos de frijol en los eritrocitos de carnero, conejo, ratón y humanos ABO. Como se observa, los títulos de hemaglutinación fueron altos con todos los extractos probados. Esta propiedad hemaglutinante fue el primer resultado positivo de nuestros estudios.

2. Actividad inmunosupresora

Cuando los ratones fueron tratados con 2.5 a 4.2 mg de proteína del extracto de frijol y 2 días después inmunizados i.p. con eritrocitos de carnero (2×10^8 células), se observó una reducción de la respuesta inmune humoral (Tabla 4). Los extractos de *Phaseolus vulgaris* (garbancillo y canario) y *Phaseolus coccineus* (alubia), indujeron inmunosupresión total a estas dosis. Se obtuvo una menor inhibición, aunque significativa ($p < 0.05$) en los ratones tratados con las otras variedades de frijol, observando títulos de Log_2 3.3 a 6.3 en comparación con los títulos de los ratones testigo donde fue de Log_2 8.3. Para eliminar la posibilidad de que existieran anticuerpos naturales contra los eritrocitos de carnero (Forsman) en el ratón, éstos se sangraron y los sueros se probaron antes de iniciar cualquier tratamiento.

Para determinar la dosis mínima de extracto de frijol que suprime la respuesta inmune, se llevó a cabo una dosis

T A B L A I

NOMBRE BOTANICO, CARACTERISTICAS, NOMBRE LOCAL, ABREVIATURAS Y NO. DE REGISTRO DE LAS
MUESTRAS DE SEMILLAS DE FRIJOL UTILIZADAS

CARACTERISTICAS					
NOMBRE BOTANICO	FORMA	COLOR	NOMBRE LOCAL	ABREVIATURA	NO. DE REG.
<i>Phaseolus coccineus</i>	Reniforme	Blanco	Alubia	Ph. c. (Al.)	85
<i>Phaseolus coccineus</i>	Reniforme	Rojo-oscuro	Ayocote	Ph. c. (A.)	90
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Esférico	Amarillo-verdoso	Garbancillo	Ph. v. (G.)	88
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Elíptico	Marrón-claro	Canario	Ph. v. (C.)	83
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Reniforme	Marrón-manchado	Pinto	Ph. v. (P.)	82
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Reniforme	Marrón-rayado	Ojo de cabra	Ph. v. (O.C.)	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Reniforme	Morado-claro	Flor de Mayo	Ph. v. (F.M.)	84
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Elíptico	Negro	Negro Querétaro	Ph. v. (N.Arr.)	86
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Reniforme	Negro	Negro Veracruz	Ph. v. (N.AB.)	87
<i>Canavalia ensiformis</i>	Reniforme	Blanco	Jack bean	C. e. (J.B.)	

T A B L A 2

HEMAGLUTINACION DE ERITROCITOS HUMANOS ABO CON EXTRACTOS DE
FRIJOL^{a)}

MUESTRAS DE FRIJOL ^{b)} USADAS (NOMBRE LOCAL)	ERITROCITOS HUMANOS		
	TIPO A ^{c)}	TIPO B	TIPO O
Alubia	8.3	10.3	9.3
Ayocote	7.3	7.3	5.3
Garbancillo	8.3	12.3	10.3
Canario	9.3	12.3	11.3
Pinto	11.3	14.3	12.3
Ojo de Cabra	7.3	8.3	7.3
Flor de Mayo	9.3	10.3	9.3
Negro Querétaro	8.3	12.3	10.3
Negro Veracruz	8.3	11.3	10.3
Bayo	9.3	12.3	10.3
Jack bean	0.0	0.0	0.0

- a) Extractos de frijol ajustados a una concentración de 2 mg/ml de proteína.
- b) Los nombres botánicos de las muestras de frijol se describen en la tabla 1.
- c) Los resultados están expresados como el Log_2 de la recíproca del título.

T A B L A 3

HEMAGLUTINACION DE ERITROCITOS DE CARNERO, CONEJO Y RATON CON EXTRACTOS DE FRIJOL^{a)}

MUESTRAS DE FRIJOL ^{b)} (NOMBRE LOCAL)	ERITROCITOS DE ^{c)} CARNERO	ERITROCITOS DE CONEJO	ERITROCITOS DE RATON
Alubia	11.3	12.3	12.3
Ayocote	11.3	11.3	11.3
Garbancillo	12.3	13.3	12.3
Canario	13.3	12.3	14.3
Pinto	14.3	13.3	13.3
Ojo de Cabra	12.3	10.3	13.3
Flor de Mayo	0.0	12.3	14.3
Negro Querétaro	12.3	12.3	14.3
Negro Veracruz	11.3	12.3	12.3
Bayo	11.3	12.3	13.3
Jack Bean	0.0	11.3	13.2

a) Extractos de frijol ajustados a una concentración de 2 mg/ml de proteína.

b) Los nombres botánicos de las muestras de frijol se describen en la tabla 1.

c) Los resultados están expresados como el Log_2 de la recíproca del título.

T A B L A 4

ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA DE EXTRACTOS SALINOS DE FRIJOL^{a)}

2

NOMBRE BOTANICO	NOMBRE LOCAL	PROTEINA ^{b)} (mg)	TITULO DE HEMAGLUTINACION	NUMERO DE RATONES
<i>Phaseolus coccineus</i>	Alubia	2.7	0.0	7
<i>Phaseolus coccineus</i>	Ayocote	2.5	6.1	9
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Garbancillo	2.7	0.0	4
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Canario	2.7	0.0	5
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Pinto	4.2	3.3	11
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ojo de Cabra	4.2	3.5	8
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Flor de Mayo	2.6	4.6	9
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Negro Querétaro	2.6	5.6	9
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Negro Veracruz	2.7	6.3	7
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Bayo	3.2	5.9	8
Salina		0.0	8.3	21

a) Los extractos de frijol fueron administrados intraperitonealmente dos días antes de la inmunización con eritrocitos de carnero. El 5o. día después del estímulo antigénico, los ratones se sangraron del plexo retroorbital y el suero se probó por hemaglutinación. La probabilidad usando "t" Students contra los controles fue $p < 0.05$.

b) Determinada por el método de Biuret.

c) Los resultados de hemaglutinación están expresados como el Log_2 de la recíproca del título.

respuesta, usando 2 extractos potentes: el de alubia y el de garbancillo. Como referencia se hizo una respuesta similar usando Con A. Los resultados se muestran en la figura 1. Como puede observarse, *Phaseolus coccineus* (alubia) y *Phaseolus vulgaris* (garbancillo) poseen lectinas más potentes para inhibir la respuesta inmune del ratón que la Con A, puesto que 200 µg de los extractos disminuyeron el título de hemaglutinación de Log_2 8-10 a niveles menores de Log_2 3.

3. Efecto del tiempo transcurrido entre la administración de la lectina y los eritrocitos de carnero en la inmunosupresión

Con el objeto de saber cuanto tiempo debe transcurrir entre la administración de la lectina y el antígeno para que la inmunosupresión sea óptima; se trataron grupos de ratones con 300 µg del extracto de alubia los días 7, 4, 2 ó 1 antes de la inmunización, el mismo día y 1 ó 2 días después del antígeno. En los resultados señalados en la figura 2, vemos que los extractos de alubia y garbancillo indujeron marcada inmunosupresión cuando se inyectaron 24-48 horas antes de la administración del antígeno. Cuando se administraron 7 ó 4 días antes, 1 ó 2 días después, o simultáneamente con el antígeno, no se indujo inmunosupresión significativa.

4. Duración de la inmunosupresión

Con el propósito de saber si las lectinas de frijol producen un efecto inmunosupresor duradero, se inyectaron ra-

FIGURA 1

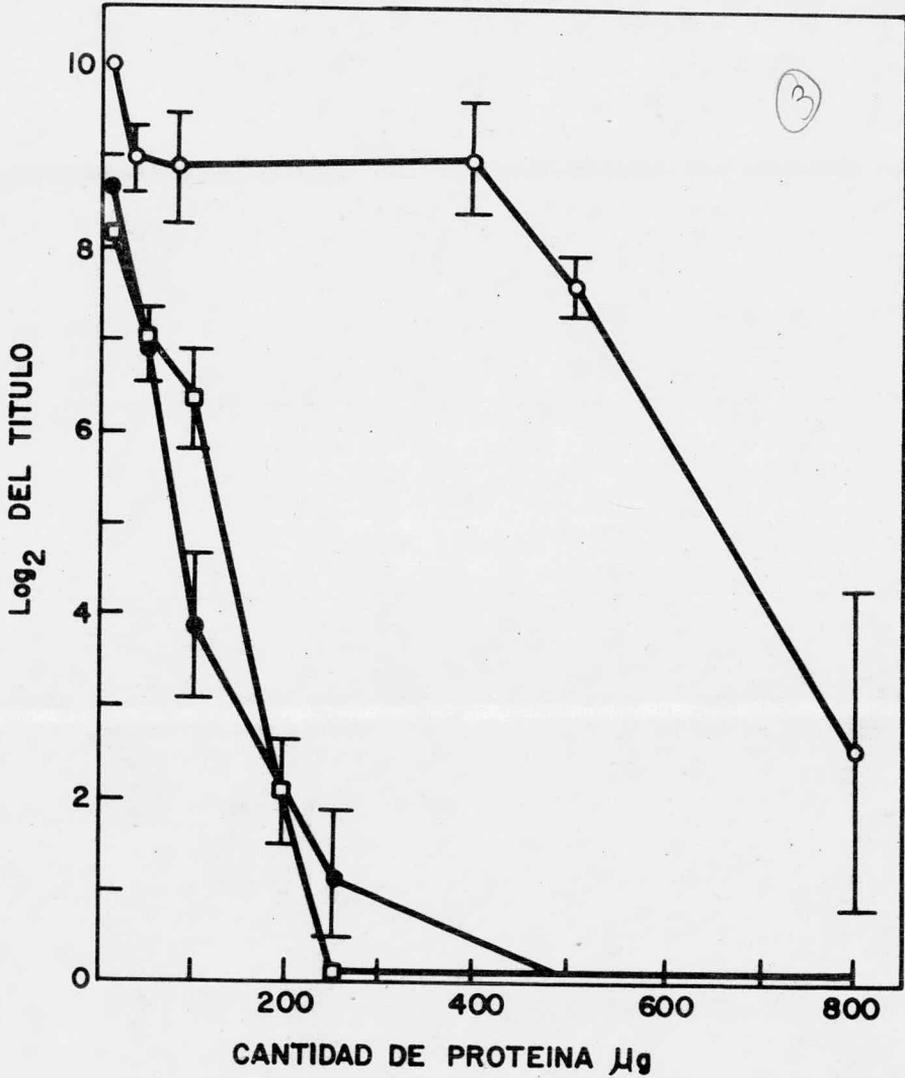


FIG. 1.- Actividad inmunosupresora de los extractos de frijol en ratones inyectados i.p. 2 días antes de inmunizarlos con una dosis de 2×10^8 eritrocitos de carnero. Cinco días después de administrado el antígeno los ratones se sangraron y el suero se tituló. Extracto de "Alubia" (●—●), extracto de Garbancillo (□—□) y Con A (o—o). Los valores representan el promedio \pm D.E. de 3 a 5 ratones.

FIGURA 2

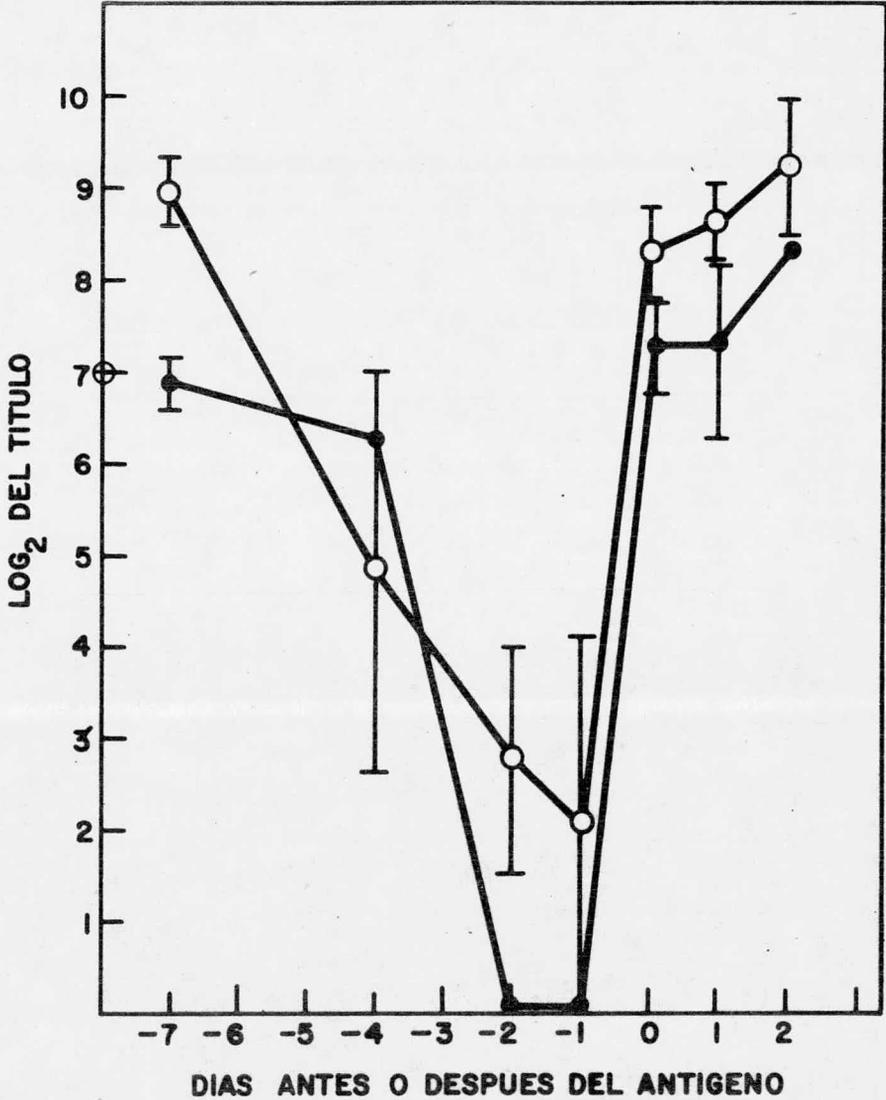


FIG. 2.- Inmunosupresión de ratones inyectados con 300 μ g de extracto de frijol a diferentes intervalos antes o después de una sola dosis de 2×10^8 eritrocitos de carnero. La figura indica el título del suero 5 días después de la inyección del antígeno, graficado contra el día de administración del extracto. Cada punto es el promedio \pm D.E. de 3 muestras. Extracto de "Alubia" (●—●), extracto de Garbancillo (○—○) y control con salina (○).

tones con una sola dosis de 500 μg de *Phaseolus coccineus* (alubia) y se sangraron 2,5,8,10,12,15,30 y 50 días después de administrado el antígeno. En la figura 3 observamos una inmunosupresión marcada durante los días 2 al 15. Posteriormente el título de anticuerpos ascendió progresivamente hasta un máximo observado el día 30. Los títulos de anticuerpos de los ratones tratados permanecieron siempre más bajos que los de los ratones control, los cuales fueron inyectados únicamente con eritrocitos de carnero. La inmunosupresión de la respuesta a eritrocitos de carnero parece ser un fenómeno duradero, ya que al final de un período de casi 2 meses todavía se observa un ligero efecto supresor.

5. Efecto del extracto de alubia en la respuesta inmune secundaria

Un intento para aclarar la acción de las lectinas a nivel celular en el sistema inmune del ratón, se hizo probando el efecto del extracto de alubia en la respuesta inmune secundaria. En estos experimentos los ratones se trataron con 750 μg de lectina 2 días antes de la primera inmunización con eritrocitos de carnero y/o 2 días antes del segundo estímulo antigénico, verificando siempre la respuesta primaria. El intervalo entre la primera y segunda inyección del antígeno fue de 30 días. Cuando los ratones se trataron con una sola dosis de lectina 2 días antes de la primera inmunización, se observó una supresión de la respuesta secundaria (Tabla 5). Un efecto

FIGURA 3

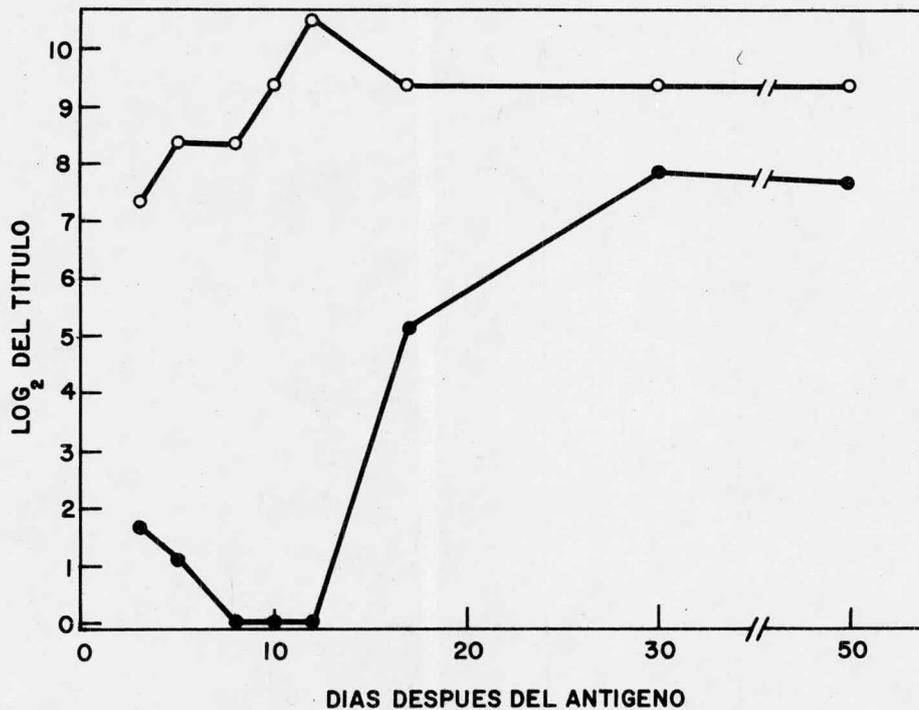


FIG. 3.- Duración de la inmunosupresión obtenida en ratones después de inyectarlos i.p. con 500 µg del extracto de "Alubia" 2 días antes de la inmunización con 2×10^8 eritrocitos de carnero. Cada punto representa el promedio \pm D.E. de 3 ratones sangrados el día indicado. Ratones tratados con extracto de frijol (●—●), ratones control inyectados con salina (○—○).

T A B L A 5

RESPUESTA PRIMARIA Y SECUNDARIA

TITULOS DE HEMAGLUTINACION DE RATONES TRATADOS CON EXTRACTO DE ALUBIA

DIAS DE INMUNIZACION Y TRATAMIENTO				Log ₂ (RECIPROCA DEL TITULO) RESPUESTA PRIMARIA	Log ₂ (RECIPROCA DEL TITULO) RESPUESTA SECUNDARIA
- 2	0	28	30	Día 5 ^{a)}	Día 35
Lectina ^{b)}	SRBC ^{c)}	-	SRBC	0 ^{d)}	5.9 ± 0.33
Lectina	SRBC	Lectina	SRBC	0	6.9 ± 0.33
-	SRBC	Lectina	SRBC	9.3 ± 0	7.9 ± 0.33
-	SRBC	-	SRBC	8.3 ± 0	11.3 ± 0

a) Día de sangrado.

b) 750 µg de extracto de alubia. Inyección intraperitoneal.

c) SRBC: eritrocitos de carnero 2 x 10⁸ células/0.1 ml.

d) Log₂ de la recíproca del título. ± error estándar de la media.

(5)

similar se observó cuando la lectina se administró antes de los dos estímulos antigénicos. Cuando la lectina se administró solamente antes del segundo estímulo antigénico también se inhibió la respuesta secundaria, ya que no progresó con la cinética característica.

6. Efecto de la vía de administración de la lectina y del antígeno en la inhibición de la respuesta inmune

Debido a que en los experimentos anteriores la vía de inyección de la lectina y el antígeno fue i.p., era interesante estudiar si la lectina había afectado únicamente un grupo de células de un compartimiento anatómico preferencialmente expuesto. Por lo tanto se estudió el efecto de otras vías de administración. Las figuras 4 y 5 muestran los resultados de estos experimentos. Como se observa, la supresión fue notable cuando la lectina y el antígeno se administraron por la misma vía, ya sea i.v. o i.p., pero no hubo efecto cuando la lectina se inyectó por vía i.v. y el antígeno por vía i.p. o viceversa.

7. Inactivación del principio inmunosupresor

Como el material empleado en estos experimentos fue extracto crudo, era factible pensar que el efecto inmunosupresor se debiera a la acción de algún componente citotóxico no proteico, que actuara en el animal incapaciándolo para responder inmunológicamente. Por lo que se realizaron experimentos inactivando 3 de los extractos por calentamiento a ebullición en baño María por 30 minutos. Fue patente la desaparición de la

FIGURA 4

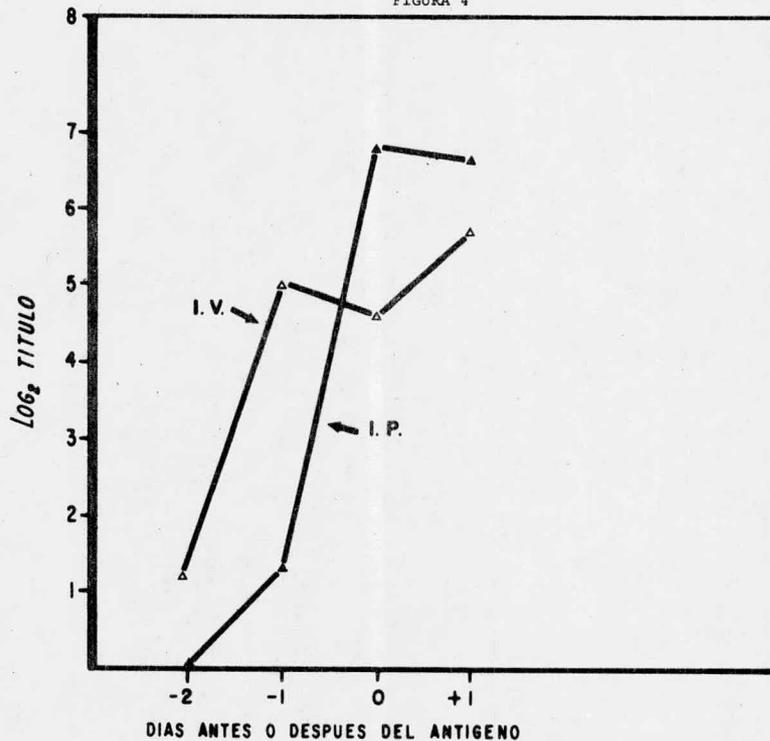
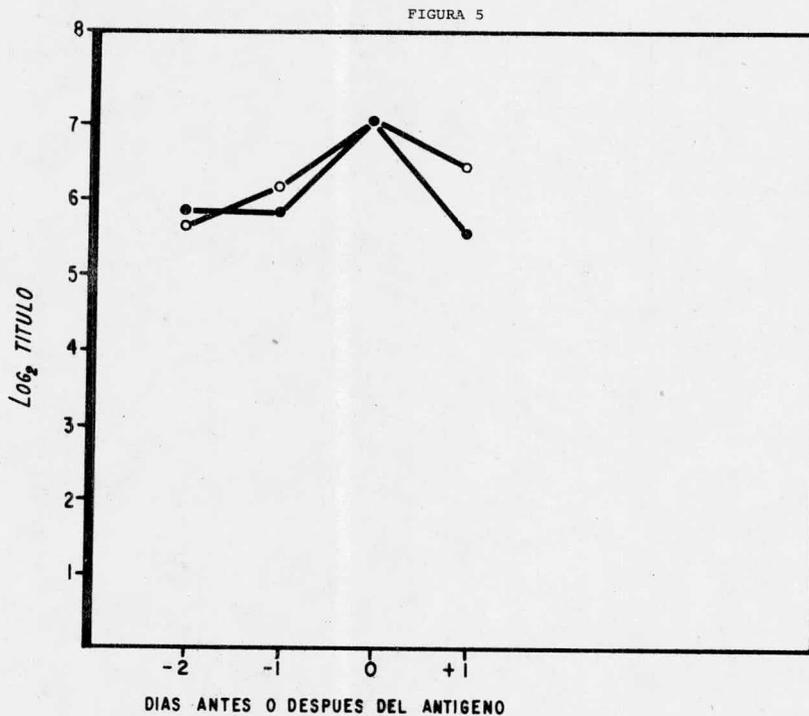


FIG. 4.- Efecto de la administración de la lectina y el antígeno por la misma vía. Los ratones se trataron con lectina de "Alubia" a diferentes intervalos antes o después de inmunizarlos con 2×10^8 eritrocitos de carnero, ambos inyectados por vía i.p. (\blacktriangle — \blacktriangle) o i.v. (\triangle — \triangle). Cada punto representa el promedio de 3 ratones sangrados 5 días después de administrar el antígeno.

6



6

FIG. 5.- Efecto de la administración de la lectina y el antígeno por diferentes vías. Los ratones se trataron con lectina de "Alubia" por vía i.p. a diferentes intervalos antes o después de inmunizarlos con 2×10^8 eritrocitos de carnero por vía i.v. (o—o), o viceversa lectina vía i.v. y eritrocitos de carnero vía i.p. (●—●).

actividad inmunosupresora de los extractos de alubia, garbancillo y canario en estas condiciones (ver figura 6).

8. Semipurificación con sulfato de amonio

Se intentó purificar las lectinas de los extractos de *Phaseolus coccineus* (alubia) y *Phaseolus vulgaris* (garbancillo), por fraccionamiento de los extractos crudos con sulfato de amonio. La actividad inmunosupresora del extracto de alubia se concentró en la fracción precipitada a 66% de saturación y en el sobrenadante (Tabla 6). La actividad para el de garbancillo estuvo presente en las fracciones precipitadas a 50 y 66% de saturación y en el sobrenadante. Como las fracciones presentaron un ligero efecto supresor, se descartó el método por ineficaz.

Por el momento, podemos aseverar que el principio inmunosupresor es una proteína puesto que precipita con sulfato de amonio y es termosensible.

9. Efecto del extracto de alubia en la respuesta inmune del ratón a la albúmina de huevo y la albúmina bovina

Se demostró en el presente estudio que la lectina del frijol inhibe la respuesta inmune a los eritrocitos de carnero. Con el objeto de saber si esta supresión era general, se emplearon antígenos solubles como la albúmina de huevo y la bovina. Los ratones se inyectaron con 1000 µg de extracto de alubia por vía i.p., 2 días antes de inmunizarlos con 750 µg de albú-

FIGURA 6

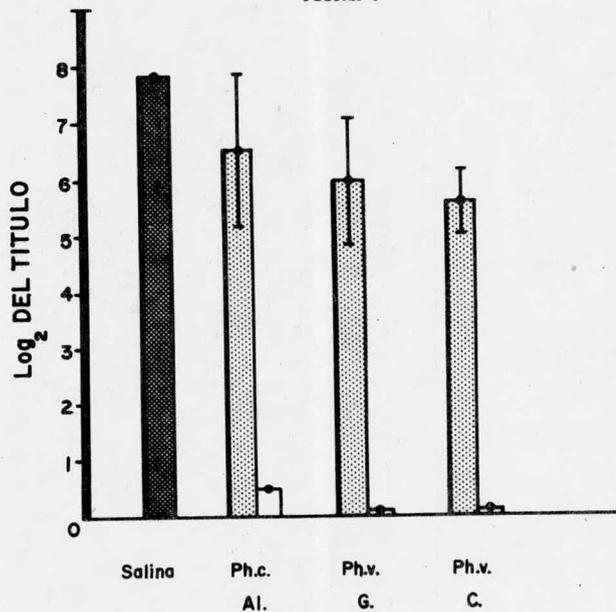


FIG. 6.- Desaparición del efecto inmunosupresor. El extracto de frijol se ajustó a 1 mg/ml de proteína y se calentó a ebullición en baño María por 30 min. El material se centrifugó a 3000 x g y el sobrenadante se administró a ratones por vía i.p. 2 días antes de inmunizarlos con 2×10^8 eritrocitos de carnero. Las barras representan el promedio \pm D.E. de 3 muestras de suero. Extracto calentado \square . Extracto no calentado \boxtimes .
 \square , salina \boxtimes .

T A B L A 6

FRACCIONAMIENTO CON SULFATO DE AMONIO DE DOS EXTRACTOS DE FRIJOL

PASO DE PURIFICACION	PHASEOLUS COCCINEUS (ALUBIA)			PHASEOLUS VULGARIS (GARBANCILLO)		
	CANTIDAD DE PROTEINA TOTAL (mg) ^{a)}	RENDIMIENTO	TITULO DE HEMAGLUTINACION	CANTIDAD DE PROTEINA TOTAL (mg) ^{a)}	RENDIMIENTO	TITULO DE HEMAGLUTINACION
Extracto salino de frijol (15 g)	1340.0	100.0	6.9	1183.13	100.0	3.9
20% SAS ^{c)}	11.7	0.87	n.d. ^{d)}	20.74	1.75	4.8
33% "	91.5	6.82	6.3	44.27	3.74	5.8
50% "	470.0	35.07	5.8	371.74	31.42	1.6
66% "	183.0	13.65	5.4	250.56	21.17	2.1
Sobrenadante	472.5	35.22	2.1	374.66	31.66	2.6
Proteína recuperada	1228.7	91.63		1061.97	89.74	

a) Determinada por el método de Nessler.

b) Cada animal recibió 100 µg de la fracción indicada. Los resultados están expresados como Log₂ del inverso del título.

c) Porcentaje de saturación con sulfato de amonio saturado.

d) n.d.: no determinado.

mina de huevo o de bovino. En la administración del antígeno se ensayaron 3 condiciones diferentes: i.p. sin adyuvante, i.p. con adyuvante completo de Freund (ACF) e intramuscular (i.m.) con el mismo adyuvante. Los ratones fueron sangrados 5, 10 y 15 días después del estímulo antigénico y los sueros obtenidos fueron titulados usando la hemaglutinación pasiva. En los resultados presentados en las figuras 7 y 8 observamos que la respuesta inmune de ratones tratados con lectina en lugar de disminuir es muy similar a la de los ratones testigos.

10. Efecto del extracto de alubia en la respuesta inmune del ratón hacia albúmina de huevo, albúmina sérica bovina y gamma globulina bovina acoplados a Sepharose

En vista de que la lectina de alubia no tuvo efecto inmunosupresor de la respuesta inducida por los antígenos solubles, éstos se acoplaron a Sepharose por medio de BrCN para convertirlos en antígenos particulados. Con esta preparación se inmunizaron ratones por vía i.p. 2 días después de haberlos inoculado con la lectina por la misma vía, y se sangraron como en el caso anterior. La cantidad de proteína acoplada a Sepharose se determinó por el método de Nessler; los valores de proteína obtenidos por ml de Sepharose fueron de 2.5 mg para AH, 3.4 mg para ASB y 4.7 para GGB. Se emplearon 750 µg de cada preparación por ratón. En la figura 9 vemos que la lectina de alubia suprime significativamente la respuesta inmune del ratón, hacia los 3 antígenos acoplados a Sepharose (particulados), lo que indica que el estado físico del antígeno es crí-

FIGURA 7

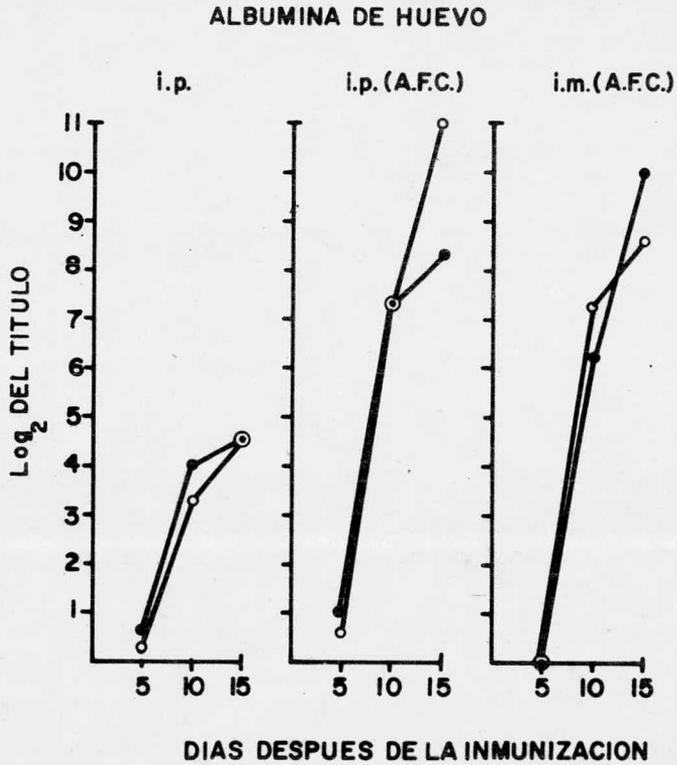


FIG. 7.- Efecto del extracto de "Alubia" en la respuesta inmune del ratón hacia albúmina de huevo. Los ratones se trataron con 100 µg del extracto por vía i.p. 2 días antes de inmunizarlos con 750 µg de albúmina de huevo empleando 3 condiciones: por vía i.p., por vía i.p. (A.C.F.) o por vía i.m. (A.C.F.) y se sangraron 5, 10 y 15 días después de administrado el antígeno. Los sueros fueron titulados por hemaglutinación pasiva. Ratones tratados con extracto de "Alubia" (o—o), ratones testigos inyectados con salina (●—●).

FIGURA 8

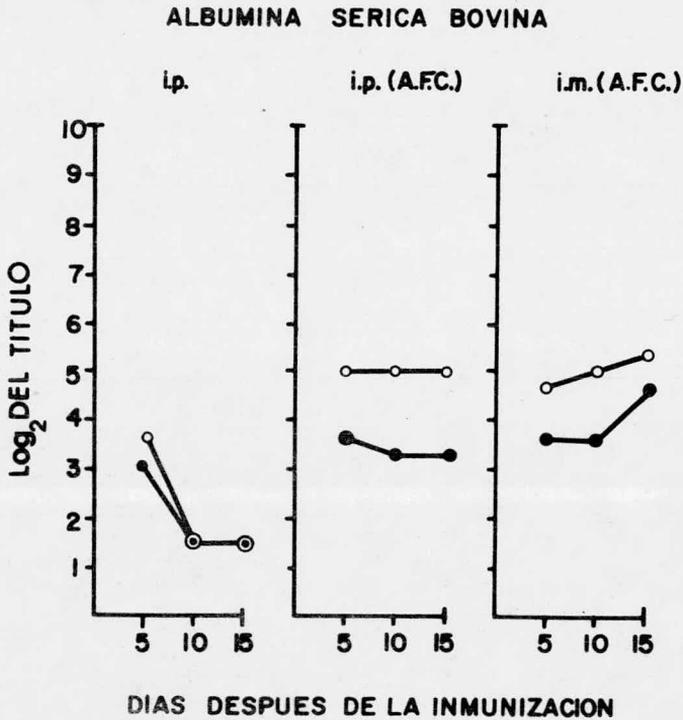
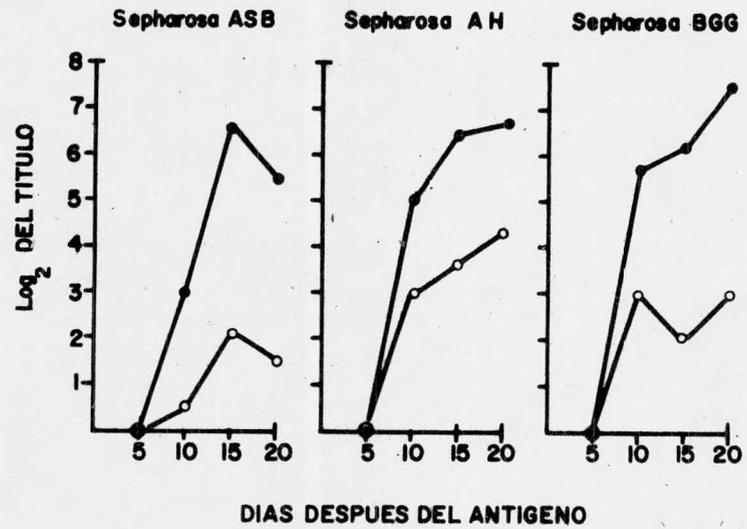


FIG. 8.- Efecto del extracto de "Alubia" en la respuesta inmune del ratón hacia albúmina sérica bovina. Los ratones se inocularon con 1000 µg del extracto por vía i.p. 2 días antes de inmunizarlos con 750 µg de albúmina sérica bovina empleando 3 condiciones: por vía i.p., por vía i.p. (A.C.F.) o por vía i.m. (A.F.C.) y fueron sangrados 5, 10 y 15 días después de inmunizados con el antígeno. Los sueros se titularon por hemaglutinación pasiva. Ratones tratados con extracto de "Alubia" (o—o), ratones testigos inyectados con salina (●—●).

FIGURA 9



9

FIG. 9.- Inmunosupresión de la respuesta inmune hacia A.H., ASB y GGB acopladas a sefarosa 4-B por extracto de "Alubia". Los ratones se inocularon con 1000 µg del extracto 2 días antes de inmunizarlos con 750 µg del antígeno por la misma vía. Cinco días después de la administración del antígeno se sangraron y el suero se tituló por hemaglutinación pasiva. Ratones tratados con extracto de "Alubia" (○—○), ratones control inyectados con salina (●—●).

tico para que se lleve a cabo el efecto supresor por lectinas.

11. Efecto de las lectinas sobre la síntesis de DNA en células ✓

Se cultivaron células de bazo de ratón normal, células de bazo tratados con anti- θ y timocitos de ratón, en presencia de pequeñas cantidades de extracto de *Phaseolus coccineus* (alubia) y *Phaseolus vulgaris* (garbancillo); y con timidina radiactiva 12 h antes de la terminación del cultivo. La adición de 1 a 10 μg del extracto promueve una estimulación celular que se refleja en el aumento de la incorporación de timidina. El efecto se demostró en las células de bazo completo, pero no se demostró en las de bazo tratadas con anti- θ ni tampoco en los timocitos. Se utilizó Con A (mitógeno de células T) y LPS (mitógeno de células B) en experimentos similares para tener una referencia de la potencia relativa de las lectinas de frijol (Tabla 7).

T A B L A 7

EFFECTO DE LAS LECTINAS DE FRIJOL EN LA INCORPORACION DE ^3H TIMIDINA EN CULTIVO DE CELULAS DE BAZO, CELULAS DE BAZO TRATADAS CON ANTI θ Y TIMOCITOS^{a)}

ADICION AL CULTIVO	CELULAS DE BAZO (cpm)	CELULAS DE BAZO TRATADAS CON ANTI θ (cpm)	TIMOCITOS (cpm)
Nada	8 539	4 332 \pm 38	302 \pm 105
Extracto Salino (Alubia) 5 μg	200 076 \pm 3952	n.d. ^{d)}	640 \pm 64
Extracto Salino (Garb.) 10 μg	83 961 \pm 4016	n.d.	595 \pm 121
Sobrenadante ^{b)} (Alubia) 1 μg	99 800 \pm 5489	6 579 \pm 212	n.d.
Fracción 66% ^{c)} (Garb.) 8 μg	23 427 \pm 627	2 949 \pm 320	n.d.
Con A 1 μg	252 521 \pm 3213	9 053 \pm 233	54 342 \pm 5908
LPS 12.5 μg	27 938 \pm 4754	30 754 \pm 1054	n.d.

a) Células de bazo (1.5×10^6 , células de bazo tratadas con anti θ (2.6×10^6) y timocitos (5×10^6) fueron cultivados por 72 h; ^3H Timidina se adicionó a los 60 h de cultivo. La figura representa cpm de la fracción insoluble con ácido tricloroacético (\pm es error estándar de la media). Todos los resultados son promedio de cultivos triplicados.

b) Sobrenadante después de precipitar a 66% con sulfato de amonio saturado.

c) Fracción precipitada a 66% con sulfato de amonio saturado.

d) n.d. no determinado.

CAPITULO IV

DISCUSION

DISCUSION

En este estudio se ha demostrado que los extractos de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus*, tienen lectinas que administradas en ciertas condiciones inhiben la respuesta inmune *in vivo*, además, en las células inmunocompetentes *in vitro*, inducen la mitogénesis. El efecto más notable de estas lectinas es el de suprimir la respuesta inmune del ratón cuando se administran 2 días antes del antígeno.

Las lectinas estudiadas aquí parecen ser inmunosupresores más potentes que Con A y PHA, ya que cantidades similares de extractos crudos de alubia y garbancillo inducen mejor inmunosupresión que la Con A pura (Figura 1) y se requieren 250-500 μ g de PHA para suprimir la respuesta inmune del ratón a eritrocitos de carnero (12).

Aunque en este trabajo se emplearon extractos crudos de frijol, es poco probable que la depresión inmune pueda atribuirse a un componente citotóxico no proteico puesto que el principio inmunosupresor se destruye por calentamiento y precipita con sulfato de amonio, lo que indica su naturaleza proteica.

La probabilidad de que la aglutinación de los eritrocitos de carnero *in vivo* producida por la lectina sea la responsable de la supresión de la respuesta inmune en el ratón, es mínima ya que no hay una relación directa entre capacidad hemaglutinante *in vitro* e inmunosupresora *in vivo* (Tablas 3 y 4). El título de hemaglutinación es similar para todos los ex-

tractos; no obstante, no todos inmunosuprimen con la misma intensidad.

El efecto supresor está relacionado con las siguientes características: la dosis de la lectina administrada, la relación entre el tiempo de administración de la lectina y el antígeno, la vía de inyección del antígeno y la lectina, el estado físico del antígeno y posiblemente la especie animal inmunizada, puesto que en los conejos Romball y Weigle (19) encontraron aumento en la respuesta inmune cuando administraron Con A simultáneamente con los eritrocitos de carnero por vía intravenosa.

Cuando el extracto de frijol se administró 24 a 48 h antes del antígeno, se obtuvo supresión inmunológica, pero cuando se administró antes o después de este intervalo no hubo alteración de la respuesta. De los trabajos recientes *in vitro* con células de bazo de ratón, sabemos que la Con A es capaz de activar dos poblaciones diferentes de células T; una de células T "facilitadoras" y otra de células T "supresoras" de la respuesta humoral (20). La activación *in vivo* de una de estas poblaciones parece depender del estado de diferenciación en que se encuentre el linfocito en el momento de unirse a la lectina; por esto, el tiempo de administración de la lectina es crítico para obtener inmunosupresión.

Los resultados de los experimentos donde la lectina fue inyectada por diferentes vías (Figuras 4 y 5), nos da una idea acerca del sitio de acción de la lectina en la supresión de la respuesta inmune. Cuando la lectina y el antígeno se in-

yectaron por la misma vía ya fuera i.p. o i.v. hubo supresión marcada, mientras que cuando la lectina y el antígeno se inyectaron por diferentes vías, no hubo supresión. Estos resultados parecen indicar un efecto local de la lectina en una población celular involucrada en la primera interacción con el antígeno.

La supresión por extractos de alubia no se presentó cuando el antígeno se administró en forma soluble, pero apareció cuando los mismos antígenos se presentaron en forma particulada. Es posible que cuando el antígeno se presenta en forma particulada exista un efecto sobre los macrófagos inducida por factores supresores de linfocitos T. Este efecto multicelular podría interferir en la cooperación para la activación de linfocitos B que se requiere en la respuesta inmune (21).

Los extractos de frijol inducen un efecto mitogénico en los linfocitos T de bazo, pero no lo hacen en los linfocitos B (células de bazo tratadas con anti- θ) ni tampoco en los timocitos. Estos datos sugieren que los linfocitos T maduros constituyen los receptores (blancos) de las lectinas y probablemente de aquí se derive el efecto supresor. Desde luego, esta idea no excluye la cooperación de otras células en este evento. La especificidad de la estimulación *in vitro* de linfocitos por extracto de alubia y garbancillo difiere de la estimulación con Con A (estimulación de linfocitos T y timocitos) (22, 23) y de LPS (estimulación de linfocitos B) (22, 25).

Por los datos anteriores, es posible que las lectinas de frijol induzcan proliferación de las células T "supresoras" (25) y que su activación lleve a la supresión de la formación de anticuerpos por células B, ya sea por acción directa o por mediadores solubles (8) al menos tratándose de antígenos particulados. De cualquier manera, los trabajos con lectinas ayudarán a entender el mecanismo involucrado en el complejo fenómeno de la inmunosupresión experimental.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los extractos salinos (0.9% NaCl) de muestras de *Phaseolus coccineus* y *Phaseolus vulgaris* locales, contienen lectinas con actividad hemaglutinante, inmunosupresora en ratón y mitogénica en linfocitos.

La actividad hemaglutinante se demostró con eritrocitos humanos de los grupos A, B, O de carnero, de conejo y de ratón.

Para que el efecto inmunosupresor de la lectina en el ratón se lleve a cabo, es importante tomar en cuenta lo siguiente:

a) La relación entre el tiempo de administración de la lectina y el antígeno. Cuando la lectina se inyectó dos días antes del antígeno, se obtuvo la inmunosupresión óptima.

b) La vía de administración de la lectina y el antígeno. La inyección de ambos por vía intraperitoneal, es mejor que la vía intravenosa para inducir supresión de la respuesta inmune hacia eritrocitos de carnero.

c) El estado físico del antígeno. Estas lectinas no suprimieron la respuesta inmune del ratón hacia antígenos solubles (albúmina de huevo, albúmina sérica de bovino, gamma globulina de bovino), pero si la inhibieron cuando los antígenos se inyectaron en forma particulada, acoplados previamente a Sepharose-4B.

Por otro lado, se observó que las lectinas de alubia y garbancillo estimulan la síntesis del DNA *in vitro* en los

linfocitos-T maduros de ratón. Esta activación parece ser un paso necesario para la alteración de la síntesis de anticuerpos, posiblemente por la estimulación de células-T supresoras, que liberen factores solubles que interfieran con la estimulación de las células-B, o bien impidan la intervención de las células-T de ayuda.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Boyd, W.C. (1963). The Lectins: Their Present Status. *Vox Sang.* 8: 1.
2. Sharon, N. y Lis, H. (1972). Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science* 177: 949.
3. Salzman, N.P., Pellegrino, M. y Franceschini, P. (1966). Biochemical Changes in Phytohemagglutinin Stimulated Human Lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 44: 73.
4. Stobo, J.D., Rosenthal, A.S. y Paul, W.E. (1972). Functional Heterogeneity of Murine Lymphoid Cells. I. Responsiveness to and Surface Binding of Concanavalin A and Phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 108: 1.
5. Remold, H.G., David, R.A. y David, J.R. (1972). Characterization of Migration Inhibitory Factor (MIF) from Guinea Pig Lymphocytes Stimulated with Concanavalin A. *J. Immunol.* 109: 578.
6. Schwartz, H.J., Leon, M.A. y Pelley, R.P. (1970). Concanavalin A-Induced Release of Skin-Reactive Factor from Lymphoid Cells. *J. Immunol.* 104: 265.
7. Rich, R.R. y Pierce, C.W. (1974). Biological Expressions of Lymphocyte Activation. III. Suppression of plaque-Forming Cell Responses *In Vitro* by Supernatant Fluids from Concanavalin A-Activated Spleen Cell Cultures. *J. Immunol.* 112: 1360.
8. Summer, J.B. y Howele, S.F. (1936). The Identification of the Hemagglutinin of the Jack Bean with Concanavalin A. *J. Bacteriol.* 32: 227.

9. Andersson, J., Edelman, G.M., Möller, G. y Sjöberg, O. (1972). Activation of B Lymphocytes by Locally Concentrated Concanavalin A. *Eur. J. Immunol.* 2: 233.
10. Nirmul, G., Severn, C. y Taub, R.N. (1972). *In Vivo* Effect Concanavalin A. *Transplantation* 14: 91.
11. Egan, H.S., Reeder, W.J. y Ekstedt, R.D. (1974). Effect of Concanavalin A *In Vivo* in Suppressing the Antibody Response in Mice. *J. Immunol.* 112: 63.
12. Spreafico, F. y Lerner II, E.M. (1967). Suppression of the Primary and Secondary Immune Response of the Mouse by Phytohemagglutinin. *J. Immunol.* 98: 407.
13. Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.A. (1964). Alsever's Solution. En *Methods in Immunology* 2a. Ed. W.A. Benjamin, Inc. New York p. 244.
14. Kabat, E.A. y Mayer, M.M. (1967). Estimation of Protein with the Biuret and Ninhydrin Reaction. En *Experimental Immunochemistry* 2a. Ed. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. U.S.A. p. 559.
15. Avrameas, S., Taudou, B. y Chuilon, S. (1969). Glutaraldehyde, Cyanuric chloride and Tetraazotized O-Dianisidine as Coupling Reagent in the Passive Hemagglutination Test. *Immunochemistry* 6: 67.
16. March, S.C., Parikh, I. y Cuatrecasas, P. (1974). A Simplified Method for Cyanogen Bromide Activation of Agarose for Affinity Chromatography. *Anal. Biochem.* 60: 149.
17. Lanni, F., Dillon, M.L. y Beard, J.B. (1950). Determination of Small Quantities of Nitrogen in Serological Precipitates and Other Biological Materials. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74: 4.

18. Hoskin, J.M., Meynell, G.G. y Sanders, F.K. (1956). A Comparison of Methods for Estimating the Viable Count of a Suspension of Tumour Cells. *Exp. Cell Res.* 11: 297.
19. Romball, C.G. y Weigle, W.O. (1975). The Enhancing Effect of Mitogens on the *In Vivo* Immune Response of Rabbits. *J. Immunol.* 115: 556.
20. Dutton, R.W. (1973). Inhibitory and Stimulatory Effects of Concanavalin A on the Response of Mouse Spleen Cell Suspensions to Antigen. II. Evidence for Separate Stimulatory and Inhibitory Cells. *J. Exp. Med.* 138: 1496.
21. Möller, G. y Michael, G. (1971). Frequency of Antigen-Sensitive Cells to Thymus-Independent Antigens. *Cell. Immunol.* 2: 309.
22. Andersson, J., Möller, G. y Sjöberg, O. (1972). Selective Induction of DNA Synthesis in T and B Lymphocytes. *Cell. Immunol.* 4: 381.
23. Janossy, G. y Greaves, M.I. (1971). Lymphocytes Activation. I. Response of T and B Lymphocytes to Phytomitogens. *Clin. Exp. Immunol.* 9: 483.
24. Peavy, D.L., Adler, W.H. y Smith, R.T. (1970). The mitogenic Effects of Endotoxin and Staphylococcal Enterotoxin B on Mouse Spleen Cells and Human Peripheral Lymphocytes. *J. Immunol.* 105: 1453.
25. Gershon, R.K. y Warner, N.L. (1974). T Cell Control of Antibody Production. *En Contemporary Topics in Immunobiology*, Vol. 3. Plenum Publishing Corp., New York p. 1; Cooper, M.D. (Ed.).

Impresiones "LUPITA"

*Medicina 25 Frac. Copilco Universidad
Ciudad Universitaria, D. F.*