

201
79



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

AISLAMIENTO Y PARCIAL CARACTERIZACION DE
 LAS LECTINAS DE TRES ESPECIES DE PHASEOLUS

T E S I S
 QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
 QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
 P R E S E N T A
 ARACELI MENDIETA RERGIS



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.

INDICE GENERAL

	PÁG.
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN.	1
OBJETIVOS.	2
CAPITULO II	
GENERALIDADES.	3
CAPITULO III	
PARTE EXPERIMENTAL:	
<u>-MATERIAL Y MÉTODOS.</u>	35
A)EXTRACCIÓN DE LECTINAS A PARTIR DE LAS DIVERSAS ESPECIES DE FRIJOL.	36
B)SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS LECTINAS.	38
C)COLOCACIÓN DE LA MUESTRA Y RECOLECCIÓN DE FRACCIONES.	41
D)DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.	42
E)DETERMINACIÓN DE HEMAGLUTININAS, TÉCNICA DE JAFFÉ.	44
F)CULTIVOS DE LINFOCITOS.	46
G)COSECHA DE LINFOCITOS.	46

H)PREPARACIÓN DE LAMINILLAS.	47
<u>-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</u>	48
CAPITULO IV CONCLUSIONES.	102
CAPITULO V BIBLIOGRAFÍA.	104

CAPITULO 1

INTRODUCCION:

EL AISLAMIENTO DE LAS LECTINAS DE GRAN VARIEDAD DE PLANTAS HA MOSTRADO GRAN INTERÉS RECIENTEMENTE POR LOS EFECTOS EN ACCIONES BIOLÓGICAS COMO HEMAGLUTINACIÓN, TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS, INACTIVACIÓN DE CIERTOS TIPOS DE CÉLULAS TUMORALES Y REACCIONES DE PRECIPITACIÓN CON ALGUNAS ESPECIES DE POLISACÁRIDOS Y GLICOPROTEÍNAS.

ES MUY INTERESANTE LA INVESTIGACIÓN DE LAS LECTINAS DEL GÉNERO PHASEOLUS PUESTO QUE EN LOS FRIJOLES, TAN IMPORTANTES PARA LA NUTRICIÓN HUMANA SE HA ENCONTRADO UNA GRAN VARIEDAD DE FITOHEMAGLUTININAS.

DEBIDO A LA SELECTIVIDAD DE LA RESPUESTA DE AGLUTINACIÓN, LAS LECTINAS SIRVEN COMO SUSTANCIAS DE PRUEBA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN O ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LOS AZÚCARES SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS.

SON CAPACES DE DISTINGUIR ENTRE LOS GLÓBULOS ROJOS DE DISTINTOS GRUPOS SANGUÍNEOS Y GRACIAS A LA FACILIDAD CON QUE AGLUTINAN A LAS CÉLULAS MALIGNAS SUELEN SER CAPACES DE DIFERENCIARLAS DE LAS CÉLULAS NORMALES, DEBIDO A LOS CAMBIOS QUE SUFREN LAS CÉLULAS CUANDO SE VUELVEN MALIGNAS.

POR OTRA PARTE, LAS LECTINAS ESTIMULAN LA DIVISIÓN DE LAS CÉLULAS LLAMADAS LINFOCITOS, PERTENECIENTES A LOS SISTEMAS DE INMUNIDAD; DURANTE ESTE PROCESO MITÓTICO AUMENTA EL TAMAÑO DEL NÚCLEO DEL LINFOCITO Y LOS DISTINTOS CROMOSOMAS SE CONVIERTEN EN ESTRUCTURAS DISCRETAS, POR LO QUE LAS LECTINAS CONSTITUYEN UNA HERRAMIENTA IMPORTANTE TANTO EN EL ANÁLISIS CROMOSÓMICO COMO EN ESTUDIOS RELATIVOS A UNA AMPLIA GAMA DE FENÓMENOS INMUNOLÓGICOS.

OBJETIVOS:

- REALIZAR EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LECTINAS PROVENIENTES DE TRES ESPECIES DE PHASEOLUS:

PHASEOLUS COCCINEUS.

PHASEOLUS LUNATUS.

PHASEOLUS VULGARIS.

- CONOCER LA PUREZA DE LAS LECTINAS, MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS, PODER DE AGLUTINACIÓN Y DE ACTIVIDAD MITOGÉNICA.
- ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO DE DICHAS LECTINAS COMPARANDO SU ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE Y MITOGÉNICA CON UNA LECTINA COMERCIAL.

CAPITULO 2

GENERALIDADES:

LAS LECTINAS SON GLICOPROTEÍNAS CUYA CARACTERÍSTICA PRINCIPAL ES QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A LOS AZÚCARES DE LAS GLICOPROTEÍNAS DE LAS MEMBRANAS CELULARES, POSEEN MÚLTIPLES LADOS DE UNIÓN, Y CUANDO LAS LECTINAS ENTRAN EN CONTACTO CON CIERTOS SACÁRIDOS SE PONEN EN MUTUA CO NEXIÓN LIGANDO A UN GRAN NÚMERO DE CÉLULAS, PROVOCANDO SU AGLUTINACIÓN O REAGRUPACIÓN.

CADA LECTINA SE UNE DE FORMA MÁS O MENOS ESPECÍFICA A UNA DETERMINADA MOLÉCULA O A UN DETERMINADO GRUPO DE MOLÉCULAS DE AZÚCAR, VER FIG.1,

DEBIDO A LA CARACTERÍSTICA QUE POSEEN DE SELECTIVIDAD A LAS LECTINAS SE LES DIO ESTE NOMBRE EN 1954 POR WILLIAM C. BOYD, DE LA BOSTON UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE QUE FUE UNO DE LOS PIONEROS EN ESTE CAMPO LA PALABRA LECTINA DERIVA DEL LATÍN LEGERE , ESCOGER,

LAS LECTINAS SE ENCUENTRAN PRINCIPALMENTE EN LAS LEGUMINOSAS Y ES EN DONDE MÁS SE HAN ESTUDIADO, LAS LEC TINAS SON PROTEÍNAS QUE SE DESTRUYEN POR LA ACCIÓN DEL CALOR (9,49,50).

LA PRIMERA VEZ QUE SE RECONOCIÓ LA PRESENCIA DE LAS LECTINAS FUE HACE CASI 90 AÑOS, AL OBSERVAR SU CAPACIDAD PARA AGLUTINAR A LOS GLÓBULOS ROJOS, POR LO CUAL SE LES LLAMÓ HEMAGLUTININAS. MÁS TARDE SE LES LLAMÓ FITOHEMAGLU TININAS, PORQUE FUERON AISLADAS A PARTIR DE PLANTAS.

COMO LECTINA SE HA DEFINIDO: SUBSTANCIA DERIVADA DE UNA PLANTA PANAGLUTINANTE PARA LOS ERITROCITOS Y ES CO MÚNMENTE MITÓGENA (4,7).

SE HA DETECTADO LA PRESENCIA DE LECTINAS NO SOLO EN PLANTAS (INCLUYENDO A LAS BACTERIAS) SINO TAMBIÉN EN ALGUNOS INVERTEBRADOS, POR EJEMPLO CARACOLES. VIVIAN TEICHBERG DEL WEIZMANN INSTITUTE (ISRAEL), DESCUBRIÓ LA PRESENCIA DE UNA LECTINA EN LA ANGIULA ELÉCTRICA. NO OBSTANTE, PARECE QUE LAS LECTINAS ESTÁN MÁS AMPLIAMENTE DISTRIBUI

DAS ENTRE LAS PLANTAS: DE LAS 3,000 ESPECIES EXAMINADAS EN LOS ÚLTIMOS AÑOS, EN CASI 1,000 DE ELLAS SE HAN ENCONTRADO LECTINAS.

LAS LEGUMINOSAS SON PARTICULARMENTE RICAS EN LECTINAS 1.5% A 3.0% DEL CONTENIDO PROTEICO DE LA SEMILLA DE SOYA O DE JUDÍA, POR DAR UN EJEMPLO.

HASTA EL MOMENTO ACTUAL SE HA LOGRADO LA PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE UNAS 50 LECTINAS, EN SU MAYORÍA DE ORIGEN VEGETAL (2,4,7).

H. STILLWARK DIO LA PRIMERA DESCRIPCIÓN DE LO QUE AHORA LLAMAMOS LECTINA, EN UN INFORME QUE PRESENTÓ EN 1888 A LA UNIVERSIDAD DE DORPAT (ESTONIA), UNA DE LAS UNIVERSIDADES MÁS ANTIGUAS DE LA RUSIA ZARISTA. STILLWARK ESTABA INVESTIGANDO LOS EFECTOS TÓXICOS QUE TIENEN SOBRE LA SANGRE LOS EXTRACTOS DE SEMILLA DE RICINO RICINUS COMMUNIS, Y OBSERVÓ QUE PROVOCABAN AGLUTINACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS, OBTUVO PRUEBAS DEMOSTRATIVAS DE QUE EL MATERIAL RESPONSABLE DE LA AGLUTINACIÓN ERA UNA PROTEÍNA, A LA QUE LLAMÓ RICINA. TRAS UN BREVE PERÍODO, H. HELLIN, COMPROBÓ QUE EL EXTRACTO TÓXICO DE LA SEMILLA DE ABRUS PRECATORIUS TAMBIÉN PROVOCABA LA AGLUTINACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS Y LE DIÓ EL NOMBRE DE ABRINA.

PAUL EHRLINCH, BACTERIÓLOGO ALEMÁN, DESCUBRIÓ QUE ESTAS SUSTANCIAS PODÍAN UTILIZARSE PARA ESTUDIAR ALGUNOS PROBLEMAS DE INMUNOLOGÍA EN LUGAR DE USAR LAS TOXINAS BACTERIANAS CON LA AYUDA DE RICINA Y DE LA ABRINA. EHRLINCH ESTABLECIÓ EN 1890 ALGUNOS DE LOS PRINCIPIOS FUNDAMENTALES EN INMUNOLOGÍA. DEMOSTRÓ QUE EL FENÓMENO DE LA INMUNOESPECIFICIDAD ESTABA RELACIONADO CON EL ANTISUERRO. EN 1908, KARL LANDSTEINER, DEL ROCKEFELLER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH, AFIRMÓ QUE LAS LECTINAS POSEEN ESPECIFICIDAD DE ESPECIE (42,48).

LA PRIMERA LECTINA QUE SE LOGRÓ PURIFICAR FUE LA CONCAVALINA A, PROCEDENTE DE LA JUDÍA, QUE FUE CRISTALIZADA EN 1919 POR JAMES B. SUMMER DE LA UNIVERSIDAD DE CORNELL.

EN 1936, SUMMER Y STACEY F. HOWELL COMPROBARON, POR UNA PARTE, QUE LA ADICIÓN DE CONCAVALINA A A UNA SOLUCIÓN DE GLUCÓGENO, CARBOHIDRATO QUE ACTÚA COMO FORMA DE RESERVA DE LOS AZÚCARES EN LOS ORGANISMOS, PROVOCABA LA PRECIPITACIÓN DEL GLUCÓGENO DE LA SOLUCIÓN Y POR OTRA PARTE, QUE EL AZÚCAR DE CAÑA INHIBÍA LA AGLUTINACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS MEDIANTE CONCAVALINA A.

SUMMER Y HOWELL ESTABLECIERON LA HIPÓTESIS DE QUE LA HEMAGLUTINACIÓN PROVOCADA POR LA CONCAVALINA A PODRÍA SER LA CONSECUENCIA DE UNA REACCIÓN DE LA PROTEÍNA CON CARBOHIDRATOS SITUADOS SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS GLÓBULOS ROJOS.

ESTO SE CONFIRMÓ EN 1952 POR WINIFRED WATKINS Y WALTER MORGAN, DEL LISTER INSTITUTE DE LONDRES: LA ADICIÓN DE ALGUNOS AZÚCARES SENCILLOS PODÍA INHIBIR O IMPEDIR LA HEMAGLUTINACIÓN PROVOCADA POR LECTINAS. AL PARECER, LAS MOLÉCULAS DE AZÚCAR INHIBIDORAS OCUPAN LOS LADOS DE UNIÓN DE LAS LECTINAS, INTERFIRIENDO, POR TANTO, EN EL PROCESO DE UNIÓN DE LA LECTINA A LAS UNIDADES DE AZÚCAR SITUADAS SOBRE LOS GLÓBULOS ROJOS.

EN OTRAS PALABRAS, LAS LECTINAS SE UNEN A LOS AZÚCARES, Y MEDIANTE ESTA UNIÓN PROVOCAN LA AGLUTINACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS. POR EJEMPLO, LOS AZÚCARES MANOSA O GLUCOSA INHIBEN ESPECIFICAMENTE LA AGLUTINACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS POR CONCAVALINA A, INDICANDO QUE LA CONCAVALINA A SE UNE A DICHS AZÚCARES. VER FIG. 2(4,7,11,21,30).

EN 1945, BOYD HABÍA DESCUBIERTO QUE UNA LECTINA PODÍA POSEER "ESPECIFICIDAD DE GRUPO SANGUÍNEO": PODÍA AGLUTINAR A LOS GLÓBULOS ROJOS DE UN TIPO PERO NO A LOS DE OTRO. COMPROBÓ QUE LA LECTINA DEL FRIJOL DE LIMA PODÍA AGLUTINAR A LOS GLÓBULOS ROJOS HUMANOS DEL GRUPO A, PERO NO A LOS DEL GRUPO B U O. MÁS TARDE K.O. RENKONEN, DE HELSINKI, INFORMÓ QUE LAS SEMILLAS DE LOTUS TETRAGONOLUBUS CONTENÍAN UNA LECTINA ESPECÍFICA PARA LOS GLÓBULOS ROJOS DEL GRUPO O.

HAY LECTINAS QUE PRESENTAN ESPECIFICIDAD PARA LOS TIPOS A Y O. IRWIN J. GOLDSTEIN, DE LA UNIVERSIDAD DE MICHIGAN,

AI SLÓ UNA LECTINA B ESPECÍFICA DE LAS SEMILLAS DE BANDEIRAEA SIMPLICIFOLIA.

LA ESPECIFICIDAD DE ALGUNAS LECTINAS ESTÁ TAN CLARAMENTE DEFINIDA QUE PUEDEN DISTINGUIR ENTRE SÍ DISTINTOS SUBGRUPOS SANGUÍNEOS. POR EJEMPLO, LA LECTINA DE LA LEGUMINOSA DOLICHOS BIFLORUS REACCIONA MÁS INTENSAMENTE CON LOS GLÓBULOS ROJOS DEL TIPO A_1 QUE CON LOS DEL TIPO A_2 . LAS LECTINAS TAMBIÉN POSEEN ESPECIFICIDAD PARA DETERMINADOS TIPOS PERTENECIENTES A OTRA CLASIFICACIÓN DE LA SANGRE HUMANA: DIFERENCIAN EL TIPO M DEL TIPO N.

WATKINS Y MORGAN ESTABLECIERON EN 1953 LA RELACIÓN EXISTENTE ENTRE LOS AZÚCARES Y LA ESPECIFICIDAD DE GRUPO SANGUÍNEO. DEMOSTRARON QUE LA N-ACETILGALACTOSAMINA ES EL AZÚCAR QUE MENOS INHIBE LA AGLUTINACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS DEL TIPO A PROVOCADA POR LA LECTINA DEL FRIJOL DE LIMA, QUEDANDO DE ESTA FORMA DETERMINADO EL AZÚCAR RESPONSABLE DE LA ESPECIFICIDAD PARA EL TIPO A. POR OTRA PARTE, SE DEMOSTRÓ QUE EL AZÚCAR DETERMINANTE DE LA ESPECIFICIDAD PARA EL TIPO O ERA LA FUCOSA, YA QUE ES EL AZÚCAR QUE MEJOR INHIBE LA AGLUTINACIÓN DE LAS CÉLULAS DEL TIPO O OCASIONADA POR LA LECTINA DE LOTUS TETRAGONOLOBUS, ESPECÍFICA DEL TIPO O. ESTE TRABAJO FUE UNA DE LAS PRIMERAS PRUEBAS DE LA PRESENCIA DE LOS AZÚCARES EN LAS MEMBRANAS CELULARES.

LAS DIVERSAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS LECTINAS PROVIENEN TODAS DE UNA SOLA PROPIEDAD: SU CAPACIDAD DE UNIÓN CON LOS AZÚCARES (4,6,19,21,30).

CADA MOLÉCULA DE UNA LECTINA POSEE AL MENOS DOS SITIOS DE UNIÓN, CADA UNO DE LOS CUALES PUEDE ACOPLARSE A UNA MOLÉCULA COMPLEMENTARIA DE AZÚCAR O A VARIAS UNIDADES DE AZÚCAR PERTENECIENTES A UN OLIGOSACÁRIDO.

LA LECTINA SE UNE A LOS AZÚCARES DE LAS SUPERFICIES CELULARES POR MEDIO DE ESTOS LADOS DE UNIÓN, TENIENDO A DISPOSICIÓN UNA SERIE DE LECTINAS QUE DIFIEREN EN SU

ESPECIFICIDAD (POR PRESENTAR LADOS DE UNIÓN DE FORMAS DIFERENTES), SERÍA POSIBLE ADQUIRIR MUCHOS NUEVOS CO NOCIMIENTOS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE UNA DETERMINADA SUPERFICIE CELULAR, VER FIG.3,

LA AGLUTININA DE SOYA TAMBIÉN ES ESPECÍFICA PARA LA N-ACETILGALACTOSAMINA, PERO DE UNA FORMA MENOS RES TRICTIVA: LA AGLUTININA DE SOYA SE UNE A LA N-ACETILGA LACTOSAMINA TANTO SI LAS MOLÉCULAS DE AZÚCAR ESTÁN UNI DAS EN POSICIÓN ALFA COMO SI LO ESTÁN EN POSICIÓN BETA, MIENTRAS QUE LA LECTINA DE FRIJOL DE LIMA SÓLO SE UNE A LAS MOLÉCULAS DE N-ACETILGALACTOSAMINA QUE ESTÁN EN POSICIÓN ALFA. EN LAS MEMBRANAS CELULARES SE ENCUENTRAN AMBAS CONFIGURACIONES, PERO EL AZÚCAR DETERMINANTE DE LA ESPECIFICIDAD PARA EL GRUPO SANGUÍNEO A ES LA N-ACE TILGALACTOSAMINA CON UNIÓN EN POSICIÓN ALFA.

LA AGLUTININA DE SOYA NO ES ESPECÍFICA DE NINGÚN GRUPO SANGUÍNEO, POR LO QUE ADEMÁS DE UNIRSE A LA N-ACETILGALACTOSAMINA, ÉSTA SE UNE A LA GALACTOSA Y, EN CONSECUENCIA, PROVOCA LA PRECIPITACIÓN DE GLICOPROTEÍ NAS EN SOLUCIÓN, TALES COMO EL COLÁGENO QUE PRESENTA UNA GALACTOSA EN POSICIÓN TERMINAL. POR EL CONTRARIO, LA AGLUTININA DE SEMILLA DE TRIGO NO REACCIONA CON EL COLÁGENO; POSEE ESPECIFICIDAD PARA LOS OLIGOSACÁRIDOS FORMADOS POR UNIDADES DE N-ACETILGLUCOSAMINA Y SE COMBI NA, POR TANTO, CON LA QUITINA, QUE ES UN POLISACÁRIDO (POLÍMERO DE N-ACETILGLUCOSAMINA), O CON EL OVOMUCOIDE, QUE ES RICO EN ESE AZÚCAR (28,39).

LA UNIÓN DE LA LECTINA CON EL AZÚCAR ES BASTANTE DÉBIL. NO PROVOCA LA FORMACIÓN DE ENLACES COVALENTES, SINO QUE ES REVERSIBLE, COMO LA REACCIÓN DE UNA ENZIMA CON SU SUSTRATO O DE UN ANTICUERPO CON SU ANTÍGENO. DE HECHO, LA REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN QUE SE DA ENTRE UNA LECTINA Y LOS POLISACÁRIDOS O GLICOPROTEÍNAS ADECUADOS ES ANÁLOGA EN CASI TODOS SUS ASPECTOS A UN SISTEMA AN TÍGENO-ANTICUERPO; EN ELLA, LA LECTINA DESEMPEÑA EL PA PEL DEL ANTICUERPO Y EL POLISACÁRIDO O GLICOPROTEÍNA

EL PAPEL DEL ANTÍGENO.

POR EJEMPLO, EN AMBOS SISTEMAS SUCEDE QUE EL PRECIPITADO QUE SE FORMA SE SUELE DISOLVER CUANDO SE HALLA PRESENTE EN EXCESO CUALQUIERA DE LOS COMPUESTOS QUE PARTICIPAN EN LA REACCIÓN.

SE HA POSTULADO LA HIPÓTESIS DE QUE LAS LECTINAS SON ANTICUERPOS VEGETALES. SIN EMBARGO, EXISTEN DIFERENCIAS MUY MARCADAS ENTRE AMBOS TIPOS DE PROTEÍNAS. LA MÁS IMPORTANTE ES QUE LOS ANTICUERPOS SON PRODUCTOS DEL SISTEMA INMUNE DE LOS ANIMALES SUPERIORES, CUYO ORGANISMO RESPONDE AL ESTÍMULO DE LA PENETRACIÓN DE UNA SUSTANCIA EXTRAÑA CON LA ELABORACIÓN DE DICHS ANTICUERPOS; LAS LECTINAS, EN CAMBIO, SE HALLAN PRESENTES COMO PROTEÍNAS CONSTITUYENTES DE SUS ORGANISMOS Y SOBRE TODO DE LOS ORGANISMOS QUE, COMO LAS PLANTAS, SON INCAPACES DE PRESENTAR RESPUESTA INMUNE Y DE FORMAR ANTICUERPOS. OTRA DIFERENCIA CONSISTE EN EL MARGEN DE ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS, ES AMPLIO Y ABARCA NO SÓLO A LOS AZÚCARES SINO TAMBIÉN A MUCHOS OTROS TIPOS DE COMPUESTOS, COMO SON AMINOÁCIDOS, PROTEÍNAS Y ÁCIDOS NUCLÉICOS (AUNQUE POR SUPUESTO, CADA ANTICUERPO ES ESPECÍFICO PARA EL ANTÍGENO QUE PROVOCÓ SU ELABORACIÓN). NO SE CONOCE NINGUNA LECTINA QUE SEA ESPECÍFICA PARA COMPUESTOS QUE NO SEAN CARBOHIDRATOS.

UNA TERCERA DIFERENCIA RESIDE EN LA ESTRUCTURA QUÍMICA. TODOS LOS ANTICUERPOS TIENEN UNA ESTRUCTURA SIMILAR, MIENTRAS QUE LAS LECTINAS DIFIEREN MUCHO ENTRE SÍ POR SU ESTRUCTURA; EL EXAMEN DE LA COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS, DEL PESO MOLECULAR Y DE OTRAS PROPIEDADES MO

LECULARES DE UN GRAN NÚMERO DE LECTINAS DEMUESTRA QUE POSEEN POCAS CARACTERÍSTICAS COMUNES EXCEPTUANDO EL HECHO DE QUE TODAS SON PROTEÍNAS (28,29).

EN 1963 JOSEPH.C.AUE, EN EL MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL DE BOSTON, PUBLICÓ, UNA PROPIEDAD QUE SE DESCUBRIÓ POR CASUALIDAD DE LAS LECTINAS QUE ES SU CAPACIDAD PARA AGLUTINAR A LAS CÉLULAS MALIGNAS DE MANERA SELECTIVA. SE HICIERON ESTUDIOS CON LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO Y SE VIO QUE SE PROVOCABA LA AGLUTINACIÓN DE LAS CÉLULAS MALIGNAS POR EL CAMBIO QUE SUFREN ÉSTAS EN SU SUPERFICIE CELULAR, TAMBIÉN COMPROBARON LA AGLUTINACIÓN DE LAS CÉLULAS MALIGNAS OCASIONADA POR LA CONCANAVALINA A, LA CÚAL TENIA MÁS VENTAJAS QUE LA AGLUTININA DE GERMEN DE TRIGO YA QUE ÉSTA ERA DIFÍCIL DE PURIFICAR Y NO SE PODÍA OBTENER LA FORMA COMERCIAL, EN CAMBIO LA CONCANAVALINA A SE EXPENDE EN EL COMERCIO Y ES RELATIVAMENTE BARATA.

SACHS, BEN-AMI SELA, HALINA LIS Y SHARON OBSERVARON QUE LA AGLUTININA DE SOYA TAMBIÉN PODÍA DISTINGUIR LAS CÉLULAS MALIGNAS DE LAS NORMALES, Y DESDE ENTONCES SE HA DEMOSTRADO QUE NUMEROSAS LECTINAS POSEEN LA MISMA PROPIEDAD.

LAS CÉLULAS MALIGNAS SE AGLUTINAN CON CONCENTRACIONES MUY BAJAS DE DICHAS LECTINAS DE 10-15 G/ML, MIENTRAS QUE LAS CÉLULAS NORMALES NO SUELEN AGLUTINARSE A MENOS QUE LA CONCENTRACIÓN DE LA LECTINA SEA POR LO MENOS DE 10 A 20 VECES MAYOR. HAY ALGUNAS EXCEPCIONES, CIER

TAS CÉLULAS TUMORALES NO SE AGLUTINAN CON CONCENTRACIONES BAJAS DE UNA DETERMINADA LECTINA Y CIERTOS TIPOS DE CÉLULAS NORMALES SE AGLUTINAN CON UNA LECTINA, INCLUSO CUANDO LA CONCENTRACIÓN DE ÉSTA ES MUY BAJA, VER FIG.4.

BURGER HIZO UNA OBSERVACIÓN INTERESANTE; AÚN EN EL CASO DE LAS CÉLULAS NORMALES QUE NO SUELEN AGLUTINARSE EN PRESENCIA DE UNA LECTINA, SIEMPRE EXISTE UNA PEQUEÑA PORCIÓN QUE SI AGLUTINA. IDENTIFICÓ A LAS CÉLULAS AGLUTINADAS Y OBSERVÓ QUE ESTABAN EN PROCESO DE MITOSIS, Y SE DEDUJO QUE DURANTE LA MITOSIS LA MEMBRANA DE LAS CÉLULAS NORMALES SE ASEMEJA HASTA CIERTO PUNTO A LA DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS. ÉSTE HECHO LE HIZO PENSAR QUE EN EL CICLO CELULAR HABRÍA UN PUNTO DE CAMBIO CRÍTICO, VER FIG.5.

ADÉMÁS DE DETECTAR LOS CAMBIOS DE LA SUPERFICIE CELULAR QUE ACOMPAÑAN A LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA, LAS LECTINAS ESTAN PROPORCIONANDO PRUEBAS DE QUE LA SUPERFICIE CELULAR TAMBIÉN SE ALTERA A LO LARGO DE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EMBRIONARIA (2,9,13).

POR LO QUE EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS LECTINAS RADICA EN QUE HAN CONTRIBUIDO EN LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA EN BASE A SU CAPACIDAD PARA AGLUTINAR DE MANERA SELECTIVA LAS CÉLULAS MALIGNAS.

LAS LECTINAS ESTÁN DESEMPEÑANDO UN PAPEL CADA VEZ MÁS IMPORTANTE EN INMUNOLOGÍA YA QUE ESTAN AYUDANDO A CONOCER LOS MECANISMOS POR EL QUE UN ANTÍGENO, QUE ACTÚA A NIVEL DE LA SUPERFICIE CELULAR DESENCADENA DE FORMA ESPECÍFICA EL CRECIMIENTO, MADURACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LOS LINFOCITOS.

LA ESTIMULACIÓN DE LOS LINFOCITOS ES DE GRAN INTERÉS YA QUE EN LA CLÍNICA ES MUY IMPORTANTE POR QUE LA ACTIVACIÓN LINFOCITARIA ES UNA TÉCNICA IN VITRO COMÚNMENTE EMPLEADA PARA EVALUAR LA INMUNIDAD CELULAR EN LOS ENFERMOS CON INMUNODEFICIENCIA, AUTOINMUNIDAD, ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y CÁNCER (12).

EN 1960, PETER C. NOWELL, DE LA UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA SCHOOL OF MEDICINE, COMPROBÓ QUE LA FITOHEMAGLUTININA

(PHA), LA LECTINA DE LA HABICUELA COLORADA, PUEDE ESTIMULAR A LOS LINFOCITOS. DICHO DESCUBRIMIENTO FUÉ IMPORTANTE NO SÓLO FUÉ DE SUMA IMPORTANCIA PARA EL ANÁLISIS CROMOSÓMICO Y PARA EL ESTUDIO DE LAS PROPIAS LECTINAS SINO TAMBIÉN PARA CONOCER MÁS ACERCA DE LAS FUNCIONES DE LOS LINFOCITOS.

LA IMPORTANCIA DE LA PHA Y DE OTRAS LECTINAS, CUYO EFECTO MITOGÉNICO SE CONOCE AHORA, RESIDE EN QUE ESTIMULAN EL CRECIMIENTO Y LA DIVISIÓN DE LOS LINFOCITOS.

LOS PRINCIPALES CAMBIOS DE TAMAÑO Y DE FORMA Y LOS ACONTECIMIENTOS BIOQUÍMICOS QUE SE OBSERVAN EN LINFOCITOS ESTIMULADOS POR LECTINAS EN EL LABORATORIO SE ASEMEJAN BASTANTE A MUCHAS DE LAS REACCIONES DE INMUNIDAD QUE SE PRESENTAN EN LOS SERES VIVOS POR INDUCCIÓN DE UN ANTÍGENO.

CUANDO SE ESTIMULA CON LECTINAS A LOS LINFOCITOS B, ÉSTOS SON CAPACES DE SINTETIZAR INMUNOGLOBULINAS, MÁS O MENOS TAL COMO LO HACEN LAS CÉLULAS CUANDO SON ESTIMULADAS POR ANTÍGENOS EN EL LABORATORIO; LOS LINFOCITOS T PUEDEN QUEDAR TRANSFORMADOS EN "CÉLULAS ASESINAS" QUE DESTRUYEN CUALQUIER CÉLULA EXTRAÑA QUE ENCUENTREN DE LA MISMA FORMA EN QUE LO HACEN CUANDO RECHAZAN A UN TEJIDO AJENO TRANSFORMADO.

LAS LECTINAS MITOGÉNICAS TAMBIÉN SON ÚTILES PARA DETECTAR LA SENSIBILIZACIÓN PROVOCADA POR AGENTES INFECCIOSOS O POR ALGUNAS ENFERMEDADES DE AUTOINMUNIDAD Y PARA VIGILAR LOS EFECTOS DE VARIAS FORMAS DE INMUNOTERAPIA.

LOS ESTUDIOS SOBRE LA ESTIMULACIÓN MITOGÉNICA MEDIANTE LECTINAS HAN APORTADO UNA IMPORTANTE INFORMACIÓN SOBRE LA ESTRUCTURA Y LA ORGANIZACIÓN DE LOS SACÁRIDOS DE LA SUPERFICIE CELULAR. AL IGUAL QUE LA AGLUTINACIÓN, LA ESTIMULACIÓN MITOGÉNICA ES EL RESULTADO DE LA UNIÓN DE GLICOPROTEÍNAS O GLICOLÍPIDOS DE LA SUPERFICIE CELULAR:

ESTE HECHO FUÉ DEMOSTRADO POR PRIMERA VEZ CUANDO SE OB
SERVÓ QUE LA ACTIVIDAD MITOGÉNICA DE LA CONCAVALINA
A PODÍA ANULARSE AÑADIENDO UNA SOLUCIÓN DE MANOSA O GLUCOSA
AL MEDIO EN QUE INCUBABAN LOS LINFOCITOS CON LA LECTINA.

ABRAHAM NOVOGRODSKY, DEMOSTRÓ, QUE LAS DOS LECTINAS
ESPECÍFICAS PARA LA GALACTOSA, ES DECIR LA AGLUTININA
DE SOYA Y LA AGLUTININA DE CACAHUATE, NO LOGRABAN LA
AGLUTINACIÓN DE LOS LINFOCITOS DE RATA A NO SER QUE SE
ELIMINARA DE LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS AL AZÚCAR
DENOMINADO ÁCIDO NEURAMÍNICO. ÉSTO SE EXPLICA SUPONIENDO
QUE LOS AZÚCARES SE HALLAN SITUADOS SOBRE LA SUPERFICIE
DEL LINFOCITO EN UNA SECUENCIA QUE SE ENCUENTRA EN MU
CHAS GLICOPROTEÍNAS, CON EL ÁCIDO NEURAMÍNICO EN LA PUNTA
EXTERNA DE LA CADENA SEGUIDO DE LA GALACTOSA Y LA MANOSA;
QUE DICHA SECUENCIA FORMA PARTE DE LOS LUGARES RECEPTORES,
EN LA MEMBRANA CELULAR, DE LA AGLUTININA DE SOYA Y DE
CACAHUATE Y DE LA CONCAVALINA A, Y QUE, CUANDO SE REALIZA
LA UNIÓN EN DICHS LUGARES, SE DESENCADENA EL ESTIMULO
MITOGÉNICO.

LOS EXPERTOS SOBRE EL ESTIMULO DE LOS LINFOCITOS
POR LAS LECTINAS DEMUESTRAN QUE ES INICIADA POR UNOS ACON
TECIMIENTOS EN LA MEMBRANA. SI EL EFECTO DE AGREGACIÓN
DE LOS RECEPTORES DE LECTINA SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS
LINFOCITOS SE TRANSMITE AL INTERIOR DE LA CÉLULA MEDIANTE
GLICOPROTEÍNAS DE SU MEMBRANA, PODRÍA DARSE UNA REDISTRI
BUCCIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS SITUADAS EN LA CARA INTERNA DE
LA MEMBRANA. ÉSTAS PROTEÍNAS INTERNAS, AL ESTAR EN CONTACTO
DIRECTO CON EL CITOPLASMA Y, A TRAVÉS DE ÉSTE, CON EL
NÚCLEO PODRÍAN PONER EN MARCHA, DE ALGUNA MANERA LA MAQUI
NARIA CELULAR.

POR OTRA PARTE, LAS LECTINAS SUELEN SER LA BASE DEL
DIAGNÓSTICO Y DE LA TIPIFICACIÓN DE LAS PERSONAS "SECRE
TORAS".

(SECRETORES: PERSONAS QUE SEGREGAN, EN SU SALIVA, EN SU ORINA Y EN OTROS LÍQUIDOS CORPORALES, UNAS GLICOPROTEÍNAS QUE TIENEN ESPECIFICIDAD DE GRUPO SANGUÍNEO), (12).

OTROS USOS DE LAS LECTINAS ES LA SEPARACIÓN DE POLISACÁRIDOS POR UNA PARTE, Y DE GLICOPROTEÍNAS POR OTRA, O LA EXTRACCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS Y OTROS COMPUESTOS DESPROVISTOS DE AZÚCARES, PROVOCANDO LA PRECIPITACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS EN SOLUCIÓN (7,34,35).

OTRO CONCEPTO ACERCA DE LA IMPORTANCIA DE LAS LECTINAS SON LAS FUNCIONES DE ESTAS EN LA DEFENSA CONTRA LAS BACTERIAS EN LA INVASIÓN DE PLANTAS, INTERACCIÓN UNICELULAR Y MECANISMO DE RECONOCIMIENTO, ELIMINACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS Y CÉLULAS DEGRADADAS. SE HA VISTO LA ACTIVIDAD DE LAS LECTINAS EN PLANTAS, ANIMALES Y EN EL HOMBRE.

- EN LAS PLANTAS ACTÚAN INHIBIENDO EL CRECIMIENTO DE ALGUNOS HONGOS (AUNQUE AÚN SU ESTUDIO ESTÁ OSCURO),

- EN LOS ANIMALES SE HA DETECTADO QUE EN EL SISTEMA NERVIOSO (EXTRACTO DE CEREBRO) INCREMENTAN LA REASOCIACIÓN Y AGRUPACIÓN DE CÉLULAS EMBRIONARIAS DE RATÓN.

- EN EL HOMBRE PRINCIPALMENTE HAN SIDO DESCRITAS EN LINFOCITOS. LA FORMACIÓN DE ROSETAS E DE LINFOCITOS T CON ERITROCITOS DE CARNERO HAN SIDO INTERPRETADAS COMO LA INTERACCIÓN ENTRE UNA LECTINA Y UN GLICOLÍPIDO.

OTRA FUNCIÓN ES LA QUE TIENEN REFERENTE A MACRÓFAGOS, LA ACTIVIDAD DE LAS LECTINAS IMPLICA MECANISMO DE RECONOCIMIENTO. TAMBIÉN SE ADHIEREN A COLÁGENO NATIVO. LA MÁS IMPORTANTE ES SU FUNCIÓN COMO MITÓGENO, ORIGINANDO LINFOBLÁSTOS, YA QUE ACTIVAN O ESTIMULAN A LOS LINFOCITOS (4,7,30,44).

SE HA ADELANTADO MUCHO EN EL ESTUDIO DE LAS LECTINAS, PERO TODAVÍA PERMANECEN SIN CONTESTARSE NUMEROSAS PREGUNTAS REFERENTES A SUS PROPIEDADES Y FUNCIONES.

REUBEN LOTAN, DVID MIRELMAN Y SHARON, CON LA COLA
BORACIÓN DE ESRA GALUM DEL DEPARTAMENTO DE GÉNETICA VE
GETAL DEL WEIZMANN INSTITUTE, HAN COMPROBADO QUE LA AGLU
TININA DE GERME DE TRIGO INHIBE EL CRECIMIENTO DE ALGU
NOS HONGOS QUE CONTIENEN QUITINA EN SUS PAREDES CELULA
RES (LA QUITINA ES UN POLÍMERO DE N-ACETILGLUCOSAMINA),
POR LO QUE SE SUPONE QUE LA AGLUTININA DE GERME DE TRIGO
PROTEGE AL TRIGO FRENTE A HONGOS Y OTROS ORGANISMOS PA
TÓGENOS DE LOS VEGETALES QUE CONTIENEN QUITINA, AL ME
NOS DURANTE EL PERÍODO DE LA HIDRATACIÓN INICIAL DE LA
SEMILLA, LA GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO INICIAL DE LA
JOVEN PLANTA.

QUIZÁ LAS LECTINAS QUE POSEEN UNA ESPECIFICIDAD POR
UN AZÚCAR, DISTINTA DE LA DE LA AGLUTININA DE GERME DE
TRIGO, INHIBAN EL CRECIMIENTO DE OTROS MICROORGANISMOS
PATÓGENOS DE VEGETALES, CUYA SUPERFICIE EXTERNA ESTÉ
CONSTITUIDA POR POLISACÁRIDOS CONSTRUÍDOS CON UNIDADES
GLUCOSÍDICAS DIFERENTES.

LAS LECTINAS NO SÓLO AGLUTINAN A LOS GLÓBULOS ROJOS
SINO TAMBIÉN A OTROS TIPOS DE CÉLULAS COMO SON LOS LIN
FOCITOS, FIBROBLASTOS (CÉLULAS PRECURSORAS DEL TEJIDO
CONJUNTIVO), ESPERMATOZOIDES, BACTERIAS Y HONGOS (13,14,37).

LA HEMAGLUTINACIÓN OCURRE EN LOS GLÓBULOS ROJOS DE
VARIAS ESPECIES DE ANIMALES: RATAS, RATONES, POLLOS. CUAN
DO SE LES PROPORCIONAN LEGUMINOSAS CRUDAS EN GRANDES
CANTIDADES SE PRODUCE LA MUERTE EN ESTOS ANIMALES, SU
ACCIÓN POSIBLEMENTE ESTÉ RELACIONADA CON LA ABSORCIÓN
INTESTINAL, PUES AL PARECER, LAS HEMAGLUTININAS SE COM
BINAN CON LAS CÉLULAS EXTERNAS DE LA PARED INTESTINAL
IMPIDIENDO DE ESTA FORMA LA ABSORCIÓN (17,25,25). EL
PURIFICAR UNA LECTINA PERMITE UTILIZARLA COMO HERRAMIENTA
PARA CONOCER MÁS SOBRE LOS MECANISMOS DE ACCIÓN DE ESTAS
SUSTANCIAS QUE DE MANERA CONSTANTE SE ENCUENTRAN EN EL
GÉNERO PHASEOLUS.

TAMBIÉN POR MEDIO DE LAS LECTINAS SE PUEDE LLEVAR

A CABO LA DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO, POR LA ALTA ESPECIFICIDAD DE ÉSTAS (7,29,58).

CUALQUIERA QUE SEA EL PAPEL DE LAS LECTINAS EN LA NATURALEZA, NO HAY DUDA DE QUE SEGUIRÁN APORTANDO UNA AYUDA IMPORTANTE EN EL PROCESO DE CARTOGRAFÍA DEL COMPLEJO PAISAJE DE LAS SUPERFICIES CELULARES, EN EL ESCLARECIMIENTO DEL PAPEL DE LOS AZÚCARES SUPERFICIALES EN EL COMPORTAMIENTO Y EL CRECIMIENTO CELULARES Y, POR TANTO, EN LA PROFUNDIZACIÓN DE NUESTRA COMPRESIÓN DE LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MALIGNAS Y NORMALES (10,13,14,37).

AGLUTINACIÓN: SE DEFINE COMO AGLUTINACIÓN LA REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO EN LA CUAL UN ANTÍGENO SÓLIDO O EN PARTÍCULAS FORMA UN CRISTAL CON UN ANTICUERPO SOLUBLE. EN LA AGLUTINACIÓN INVERTIDA EL ANTICUERPO ESTÁ INSERTADO A LA PARTÍCULA SÓLIDA Y ES AGLUTINADO POR UN ANTÍGENO INSOLUBLE, VER FIG.6.

ESTA SE DIVIDE EN DOS TIPOS:

- AGLUTINACIÓN DIRECTA; AGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS, MICROORGANISMOS U OTRAS PARTÍCULAS DIRECTAMENTE POR EL ANTICUERPO DEL SUERO. EN LA TÉCNICA DIRECTA SIMPLE, UN ANTÍGENO CELULAR O DE PARTÍCULAS INSOLUBLES ES AGLUTINADO DIRECTAMENTE POR EL ANTICUERPO. UN EJEMPLO ES LA AGLUTINACIÓN DE LOS ERITROCITOS DEL GRUPO A POR EL ANTISUERO ANTI-A.

- AGLUTINACIÓN INDIRECTA O PASIVA; LA AGLUTINACIÓN DE PARTÍCULAS O DE ERITROCITOS A LOS QUE SE LES HA FIJADO UN ANTÍGENO POR MEDIOS QUÍMICOS. SE REFIERE A LA AGLUTINACIÓN

CIÓN DE LAS CÉLULAS RECUBIERTAS DE ANTÍGENO O A LAS PARTÍCULAS INERTES QUE SON PORTADORAS PASIVAS DE ANTÍGENOS SOLUBLES. POR EJEMPLO; LA AGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS RECUBIERTOS DE D N A, PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-D N A.

LAS REACCIONES DE AGLUTINACIÓN Y DE PRECIPITACIÓN SON LA BASE DE LA MAYOR PARTE DE LAS TÉCNICAS COMUNMENTE EMPLEADAS EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA. LAS VENTAJAS IMPORTANTES DE LAS REACCIONES DE AGLUTINACIÓN SON SU ALTO GRADO DE SENSIBILIDAD Y ENORME VARIEDAD DE SUSTANCIAS IDENTIFICABLES A TRAVÉS DEL USO DE PARTÍCULAS QUE ESTÁN RECUBIERTAS POR ANTÍGENO O POR ANTICUERPO.

LAS PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN PUEDEN SER EJECUTADAS EN TUBOS DE ENSAYO O EN PLACAS DE MICROTITULACIÓN (12).

INMUNOHEMATOLOGÍA DE LOS HEMATÍES:

LOS ANTÍGENOS DE LOS HEMATÍES SON ESTRUCTURAS QUÍMICAS QUE PROPORCIONAN PROPIEDADES ESPECÍFICAS A SU SUPERFICIE Y QUE HASTA AHORA SOLO PUEDEN DETECTARSE POR LA REACTIVIDAD DE LOS HEMATÍES CON ANTICUERPOS QUE CORRESPONDEN A ESTOS ANTÍGENOS (ANTICUERPOS HOMÓLOGOS). LA MAYORÍA DE ESTAS REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO IMPLICAN LA AGLUTINACIÓN DE LOS HEMATÍES; POR ESO, LOS ANTICUERPOS SE SUELEN DENOMINAR HEMAGLUTININAS Y LOS ANTÍGENOS, HEMAGLUTINÓGENOS.

SON ISOAGLUTINÓGENOS E ISOAGLUTININAS, RESPECTIVAMENTE, LOS ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS QUE DIFERENCIAN LOS GLÓBULOS ROJOS DE UNOS INDIVIDUOS DE LOS DE OTROS DE LA MISMA ESPECIE. LAS HETEROAGLUTININAS SON ANTICUERPOS QUE REACCIONAN CON ANTÍGENOS DE HEMATÍES DE UNA ESPECIE DISTINTA.

GRUPOS SANGUÍNEOS:

LA SUPERFICIE DE LOS ERITROCITOS CONTIENE GRAN NÚMERO DE DETERMINANTES ANTIGÉNICOS, LOS CUALES SON PRODUCTOS DIRECTOS O INDIRECTOS DE LOS GENES. ÉSTOS DETERMINANTES ANTIGÉNICOS ESTÁN CLASIFICADOS EN GRUPOS SANGUÍNEOS. DENTRO DE CADA SISTEMA DE GRUPOS SANGUÍNEOS, LOS ANTÍGENOS SON HEREDADOS AL PARECER COMO PRODUCTOS DE UN GEN SENCILLO O DE UN CONJUNTO DE GENES ESTRECHAMENTE LIGADOS (12).

GRUPO ABO(ANTÍGENOS ABO): (12).

EN 1901, LANDSTEINER PUBLICÓ SU OBSERVACIÓN ACERCA DE UN PATRÓN CONSISTENTE EN LA AGLUTINACIÓN DE LOS ERITROCITOS HUMANOS POR OTROS SUEROS TAMBIÉN HUMANOS.

LAS CÉLULAS DE PERSONAS DEL GRUPO A ERAN AGLUTINADAS POR EL SUERO DE INDIVIDUOS DEL GRUPO B, Y VICEVERSA.

EN CAMBIO, LAS CÉLULAS DE OTROS INDIVIDUOS DE GRUPO O NO ERAN AGLUTINADAS POR NINGÚN SUERO. ÉSTAS PERSONAS TENÍAN ANTICUERPOS TANTO A COMO B. POCO TIEMPO DESPUÉS DEL DESCUBRIMIENTO ORIGINAL DE LANDSTEINER SE ENCONTRÓ EL CUARTO GRUPO, EL AB, SIN ANTICUERPO PARA LOS OTROS ERITROCITOS HUMANOS.

A Y B SON ANTÍGENOS CONSTITUIDOS POR CARBOHIDRATOS. LA ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA ESTÁ EN LOS AZÚCARES TERMINALES DE UN OLIGOSACÁRIDO. CUANDO EL OLIGOSACÁRIDO SE UNE A LA ESFINGOMIELINA, FORMA UNA PARTE ESENCIAL DE LA MEMBRANA CELULAR. LAS CADENAS DE LOS CARBOHIDRATOS A Y B TAMBIÉN PUEDEN APARECER EN LOS LÍQUIDOS CORPORALES EN UNA FORMA SOLUBLE ADHERIDA A UN POLIPÉPTIDO.

LOS AZÚCARES QUE FORMAN EL OLIGOSACÁRIDO PRECURSOR CON LA MISMA SUBSTANCIA EN A Y EN B. LOS ÚLTIMOS TRES AZÚCARES DE ESTA CADENA PRECURSORA LLAMADA SUBSTANCIA H SON: N-ACETIL-GLUCOSAMINA, GALACTOSA Y FUCOSA. EN EL GRUPO SANGUÍNEO A ESTÁ UNIDA UNA N-ACETILGALACTOSAMINA

A LA GALACTOSA TERMINAL DE LA CADENA PRECURSORA, Y EN EL GRUPO B ESTÁ UNIDA OTRA GALACTOSA A LA GALACTOSA TERMINAL DE LA CADENA PRECURSORA.

EN UNA SERIE DE INVESTIGACIONES FUNDAMENTALES, W.T.J. MORGAN Y W.H. WATKINS EN EL INSTITUTO LISTER EN LONDRES DESCUBRIERON QUE EL CARBOHIDRATO DETERMINANTE DE LA SUS TANCIA DEL GRUPO SANGUÍNEO B CONSISTIA EN GALACTOSA, UN AZÚCAR SIMPLE CON SEIS ÁTOMOS DE CARBONO, MIENTRAS QUE EL GRUPO DETERMINANTE DE LA SUBSTANCIA DEL GRUPO A CONSISTÍA EN N-ACETILGALACTOSAMINA. POR TANTO LA ÚNICA DIFERENCIA ENTRE LA SUBSTANCIA DEL GRUPO SANGUÍNEO A Y B EN EL HUMANO ERA EL REEMPLAZO DE UN GRUPO OH EN B POR UN GRUPO $\text{CH}_2\text{CO-NH-}$ EN A.

LAS SUBSTANCIAS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS SON GLICO PROTEÍNAS CON PESOS MOLECULARES CERCANOS A 300 000, POR LO TANTO, LA DIFERENCIA ENTRE LOS GRUPOS A Y B AFECTA SÓLO A UNA PARTE MUY PEQUEÑA DE LA MACROMOLÉCULA.

EL DESCUBRIMIENTO MUESTRA IMPRESIONANTEMENTE QUE LA ESPECIFICIDAD DE LAS REACCIONES INMUNITARIAS ESTÁ DETERMINADA POR LA ESTRUCTURA DE PEQUEÑOS GRUPOS SOBRE LA SUPERFICIE DE LAS MACROMOLÉCULAS O DE LAS CÉLULAS. SÓLO ESTOS GRUPOS SUPERFICIALES DEL ANTÍGENO PUEDEN REACCIONAR CON LAS MOLÉCULAS DE ANTICUERPO.

LOS GRUPOS SANGUÍNEOS ABO ESTÁN DETERMINADOS POR LOS GENES ALÉLICOS A, B Y O. ESTOS GENES PRODUCEN LAS ENZIMAS TRANSFERASAS QUE CONJUGAN LOS AZÚCARES AL CARBOHIDRATO PRECURSOR. ESTAS TRANSFERASAS SON ESPECÍFICAS PARA SUS SUSTRATOS: LA TRANSFERASA A PARA LA N-ACETILGALACTOSAMINA Y LA TRANSFERASA B PARA LA GALACTOSA. EL GEN O NO PRODUCE TRANSFERASA QUE PUDIERA MODIFICAR LA SUBSTANCIA DEL GRUPO SANGUÍNEO (12).

LAS PERSONAS DEL GRUPO O SOLO TIENEN LA SUBSTANCIA PRECURSORA, ES DECIR, EL ANTÍGENO H.

LA CADENA PRECURSORA ES INFLUIDA POR UNA TRANSFERASA QUE CONJUGA LA FUCOSA A LA GALACTOSA. ÉSTA TRANSFERASA ES UN PRODUCTO DEL GEN H QUE SE HEREDA EN FORMA INDEPENDIENTE DEL SISTEMA ABO.

EL GRUPO SANGUÍNEO A PUEDE SER SUBDIVIDIDO EN LOS SUBGRUPOS A_1 Y A_2 EN BASE AL NÚMERO DE SITIOS ANTIGÉNICOS A SOBRE EL ERITROCITO. APROXIMADAMENTE EL 80% DE LAS PERSONAS A Y AB PERTENECEN AL SUBGRUPO A_1 . LA ELEVADA DENSIDAD DEL ANTÍGENO SOBRE LOS ERITROCITOS A_1 SE TRADUCE EN LA FORMACIÓN DE UNA ESPECIFICIDAD ANTIGÉNICA NUEVA, PERO RELATIVAMENTE DÉBIL, TAL VEZ COMO CONSECUENCIA DE LA INTERACCIÓN DE DOS OLIGOSACÁRIDOS A ESTRECHAMENTE ADYACENTES. LAS PERSONAS A_2 Y EN ESPECIAL LAS A_2B PUEDEN TENER ANTICUERPOS PARA A_1 . HAY UNOS CUANTOS SUBTIPOS DE A QUE TIENEN UNA CANTIDAD MUCHO MENOR DEL COMPUESTO A QUE LOS ERITROCITOS A_2 . LOS ERITROCITOS A_3 REACCIONAN EN FORMA CARACTERÍSTICA CON UNA AGLUTINACIÓN MUY ESCASA ANTI-A RODEADA POR UN MAYOR NÚMERO DE ERITROCITOS AGLUTINADOS.

LOS ERITROCITOS A_x NO SON AGLUTINADOS POR ANTICUERPOS ANTI-A DERIVADOS DE PERSONAS DEL GRUPO B; SIN EMBARGO, EL SUERO DE INDIVIDUOS DEL GRUPO O PUEDE PRODUCIR UNA REACCIÓN DÉBIL. PARA ESTAR EN POSIBILIDAD DE DETECTAR AL A_x Y ALGUNOS OTROS SUBGRUPOS RAROS DE A, LOS LABORATORIOS ESPECIALIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS A MENUDO EMPLEAN EL SUERO O (LLAMADO ANTI-A,B), ADEMÁS DEL ANTI-A Y EL ANTI-B. FORMAS DÉBILES DE A DAN UN PATRÓN IRREGULAR EN LA TIPIFICACIÓN SANGUÍNEA Y ORIGINAN DIFICULTADES PARA DETERMINAR SU GRUPO. EL GRUPO B NO SE PUEDE SUBDIVIDIR PERO HAY ALGUNAS FORMAS MUY RARAS DE B DÉBIL.

PUESTO QUE LOS ANTICUERPOS PARA A_1 SON DÉBILES, NO SIEMPRE SON PRÁCTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN ENTRE A_1 Y A_2 . LA DISTINCIÓN POR LO GENERAL SE HACE EMPLEANDO

SUBSTANCIAS LLAMADAS LECTINAS. ÉSTOS EXTRACTOS DE SEMILLAS DE PLANTAS REACCIONAN SELECTIVAMENTE CON ALGUNOS ANTÍGENOS DEL GRUPO SANGUÍNEO QUE SON CARBOHIDRATOS. LA LECTINA DE DOLICHOS BIFLORUS, EN DILUCIÓN APROPIADA, AGLUTINA SÓLO A LAS CÉLULAS A_1 (12,30).

CON FRECUENCIA SE EMPLEA EN FORMA SIMULTÁNEA CON LA LECTINA DE ULEX EUROPAEUS, LA CUAL REACCIONA CON LA SUSTANCIA H, PUESTO QUE LOS ERITROCITOS A_2 ESTAN LLENOS DE SUSTANCIA H EN COMPOSICIÓN CON LOS ERITROCITOS A_1 .

LINFOCITOS: (12).

SE DEFINE COMO LINFOCITO; CÉLULA MONONUCLEAR DE 7-12 μ . DE NÚCLEO CON CROMATINA DENSAMENTE EMPAQUETADA Y UN PEQUEÑO BORDE DE CITOPLASMA. LOS CUALES SE DIVIDEN EN DOS TIPOS DE LINFOCITOS LOS CUALES SON:

LINFOCITOS T; CÉLULAS DERIVADAS DEL TIMO QUE PARTICIPAN EN DIVERSAS REACCIONES INMUNITARIAS MEDIADAS POR CÉLULAS

LINFOCITOS B; CÉLULAS ESTRICTAMENTE DERIVADAS DE LA BOLSA DE FABRICIO EN LAS AVES, Y POR ANALOGÍA, CÉLULAS EQUIVALENTES A LAS DERIVADAS DE LA BOLSA EN ESPECIES NO AVIARIAS. LAS CÉLULAS B SON LAS PRECURSORAS DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS QUE PRODUCEN ANTICUERPOS.

CÉLULA LINFOIDEA (MORFOLOGÍA): (12).

ÉL TERMINO LINFOCITO SE REFIERE A UN TIPO CELULAR QUE SE PUEDE DEFINIR POR CIERTAS CARACTERÍSTICAS DE FORMA. VISTOS EN EL MICROSCOPIO ÓPTICO, LOS LINFOCITOS SON CÉLULAS OVOIDES DE 7-12 μ DE DIÁMETRO. CONTIENEN CROMATINA NUCLEAR DENSAMENTE EMPACADA Y UN PEQUEÑO BORDE DE

CITOPLASMA QUE SE TIÑE DE COLOR PÁLIDO CON LOS COLORANTES DE ROMANOVSKY. EL CITOPLASMA CONTIENE NUMEROSOS GRÁNULOS AZURÓFILOS Y VACUOLAS OCASIONALES. EN LA ZONA DONDE SE ENCUENTRA LA MAYORÍA DE LOS ORGANELOS CITOPLÁSMICOS (ZONA DE GOLGI) EL BORDE CITOPLÁSMICO ESTÁ ENGROSADO. LA MICROCOPIA DE CONTRASTE DE FASES DE LOS LINFOCITOS VIVIENTES REVELA UN MOVIMIENTO AMIBOIDEO LENTO CARACTERÍSTICO QUE LES DA UN CONTORNO DE "ESPEJO DE MANO". CON LA MICROSCOPIA ÓPTICA CONVENCIONAL, LAS DOS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS PRINCIPALES (CÉLULAS T Y CÉLULAS B) SON INDISTINGUIBLES.

EN CONTRASTE CON EL PEQUEÑO LINFOCITO, EL BLASTOCITO TIENE UN NÚCLEO QUE SE CARACTERIZA POR EUCROMATINA LAXA, UN NÚCLEO GRANDE Y UN GRAN VOLUMEN CITOPLÁSMICO QUE CONTIENE NUMEROSOS POLIRRIBOSOMAS Y UNA ZONA DE GOLGI EXTENSAMENTE DESARROLLADA. VER FIG No.7.

LOS BLASTOCITOS SE ENCUENTRAN EN LOS GANGLIOS LINFÁTICOS IN VIVO DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN ANTIGÉNICA, O EN CULTIVOS DE LINFOCITOS ESTIMULADOS IN VITRO CON FITOMITÓGENOS. EL BLASTOCITO SE DISTINGUE FÁCILMENTE EN LA MICROSCOPIA ÓPTICA Y MIDE DE 15-30 MICRAS DE DIÁMETRO (12).

"DISTRIBUCIÓN DE LOS LINFOCITOS EN DIVERSOS TEJIDOS DEL HOMBRE".
(12).

TEJIDO	% APROXIMADO	
	CÉLULAS T	CÉLULAS B
SANGRE PERIFÉRICA	55-75	15-30
MEDULA ÓSEA	< 25	> 75
LINFA	> 75	< 25
GANGLIO LINFÁTICO	75	25
BAZO	50	50
AMÍGDALAS	50	50
TIMO	> 75	< 25

MITÓGENOS: (12,14,30),

VARIOS REACTIVOS ESTIMULAN LOS LINFOCITOS IN VITRO, INCLUYENDO LAS LECTINAS DE LAS PLANTAS, LOS PRODUCTOS BACTERIANOS, LAS SUBSTANCIAS POLIMÉRICAS Y LAS ENZIMAS. LA TRANSFORMACIÓN MORFOLÓGICA OCURRE DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON LA FORMACIÓN DE BLASTOS O EN ALGUNOS CASOS DE CÉLULAS PLASMÁTICAS. LA TRANSFORMACIÓN DE LINFOCITOS TAMBIÉN SE PUEDE EVALUAR MIDIENDO EL RNA, EL DNA O LA SÍNTESIS PROTEÍCA. LA ESPECIFICIDAD DE DIVERSAS SUBSTANCIAS MITÓGENICAS PARA LOS LINFOCITOS T Y B HUMANOS Y MURINOS SE ILUSTRAN EN EL CUADRO:

"SELECTIVIDAD DE MITÓGENOS LINFOCITARIOS PARA CÉLULAS-T Y B".(12),FITOMITÓGENOS(LECTINAS)

	<u>HOMBRE</u>		<u>RATON</u>	
	T	B	T	B
FITHEMAGLUTININA(PHA)	+	?	+	-
CONCAVALINA A (CON A)	+	-	+	-
HABICHUELA(WAX BEAN)	+	-		N.E
MITÓGENO DE LA FITOLACA (PWM)	+	+	+	+
FITHEMAGLUTININA,PWM,CON A INSOLUBLE	+	+	+	+

PRODUCTOS BACTERIANOS

LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)	-	-	-	+
TUBERCULINA AGREGADA		N.E	-	+

DIVERSOS

SUEROS ANTIIMUNOGLOBULINAS	-	+	-	?
----------------------------	---	---	---	---

(CONTINUA)

DEXTRÁN-POLIVINIL PIRROLIDONA	N.E	-	+
TRIPSINA	N.E	-	+

ESTIMULO . . . POR MITÓGENOS: (12,14).

NUMEROSAS LECTINAS VEGETALES Y OTRAS SUBSTANCIAS HAN SIDO EMPLEADAS EN LA EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS HUMANOS. EN CONTRASTE CON LOS ESTUDIOS EFECTUADOS EN RATONES, NO HAY EVIDENCIAS INCONTRVERTIBLES DE QUE LOS LINFOCITOS T Ó B SEAN ACTIVADOS SELECTIVAMENTE POR MITÓGENOS INESPECÍFICOS.

"MITÓGENOS INESPECÍFICOS QUE ACTIVAN LOS LINFOCITOS HUMANOS" (12).

<u>MITOGENO</u>	<u>FUENTE BIOL.</u>	<u>ESPECIFICIDAD</u> <u>RELATIVA</u>
FITHEMAGLUTININA	PHASEOLUS.VULGARIS	CÉL.T
CONCAVALINA A	CONCAVALIA.ENSIFORMIS	CÉL.T
GLOBULINA ANTITIMOCÍTICA	ANTISUERO.HETERÓLOGO	CÉL.T
PROT.A DE STAPHYLOCOCCUS	STAPHYLOCOCCUS.AUREUS (CEPA COWANI)	CÉL.B? CÉL.T
MITOGENO DE LA FITOLACA	PHYTOLAZA.AMERICANA	CÉL.B y T
ESTREPTOMICINA S	ESTREPTOCOCOS DEL GPO.A	?

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS T Y DE CÉLULAS B:

AUNQUE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS ESTÁN CLÍNICA MENTE RESTRINGIDAS TANTO EN RELACIÓN CON EL RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO COMO CON SUS RESPECTIVAS RESPUESTAS SUBSIGUIENTES, EXISTEN NUMEROSOS MITÓGENOS POLICLONALES QUE PUEDEN ACTIVAR GRANDES SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS. ESTE FENÓMENO ES DIGNO DE CONSIDERARSE POR CIERTOS FACTORES INESPECÍFICOS QUE REEMPLAZAN A LAS CÉLULAS T, PODRÍAN HABILITARSE CON MITÓGENOS DE LAS CÉLULAS B.

LA LECTINA DE LA HABICHUELA, LA CONCAVALINA A, SE ENLAZAN CON LAS GLICOPROTEÍNAS QUE CONTIENEN RESIDUOS DE ALFA-MANÓSIDO O DE BETA-GLÚCOSIDO Y ESTIMULA TODAS LAS CÉLULAS T MURINAS A SINTETIZAR DNA, A DIVIDIRSE Y A LIBERAR SUBSTANCIAS QUE PUEDEM REEMPLAZAR INESPECIFICAMENTE A LAS CÉLULAS T EN ALGUNAS RESPUESTAS INMUNITARIAS.

ESTA MOLÉCULA PERMITE UNA DISTINCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS T Y LAS CÉLULAS B DEL RATÓN PORQUE, AÚN CUANDO AMBOS TIPOS CELULARES FIJAN MÁS DE 10^6 MOLÉCULAS DE CONCAVALINA A POR CÉLULA, SÓLO LAS CÉLULAS T SON ESTIMULADAS CUANDO LA LECTINA ESPRESENTADA EN FORMA SOLUBLE. POR OTRA PARTE, EL LIPOPOLISACÁRIDO DE LAS BACTERIAS GRAM NEGATIVAS COMO E. COLI, ESTIMULA LAS CÉLULAS B MURINAS PERO NO LAS CÉLULAS T. MUCHOS POLIANIONES COMO EL SULFATO DE DEXTRANO Y EL ÁCIDO POLIADENÍLICO SON MITÓGENOS PARA LOS LINFOCITOS B MURINOS.

LAS CÉLULAS T PODRÍAN SER REFRACTARIAS AL ESTÍMULO CON POLIANIONES PORQUE CONTIENEN UN NÚMERO RELATIVAMENTE GRANDE DE GRUPOS CON CARGA ELÉCTRICA NEGATIVA, COMO EL ÁCIDO SIÁLICO, SOBRE SU SUPERFICIE. UN EFECTO INTERESANTE DE DOSIS SE PRESENTA EN LA MITOGÉNESIS POR EL LIPOPOLISACÁRIDO; LAS DOSIS BAJAS DEL MITÓGENO GENERAN LA FORMACIÓN DEL ANTICUERPO ESPECÍFICO, PERO LAS ALTAS DOSIS ACTIVAN LA MAYORÍA DE LAS CÉLULAS.

OTROS MITÓGENOS COMO LA FITOHEMAGLUTININA (PHA) OB
TENIDA DEL FRIJOL ROJO PHASEOLUS VULGARIS, ESTIMULA SÓ
LO LAS SUBPOBLACIONES DE LAS CÉLULAS T Ó B (12,13,14,22,52).

EN EL RATÓN, LA PHA ESTIMULA UNA SUBPOBLACIÓN DE CÉ
LULAS T Y NO ESTIMULA LAS CÉLULAS B. SIN EMBARGO, LA
SITUACIÓN CON LA PHA NO ES TAN CLARA EN EL HUMANO, POR
QUE LAS CÉLULAS T, Y PROBABLEMENTE LAS CÉLULAS B, SEAN
ESTIMULADAS. LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS B PODRÍA SER
INDIRECTA, PUES LAS CÉLULAS T DE UNA POBLACIÓN MIXTA
PODRÍAN SER ESTIMULADAS POR EL MITÓGENO Y SINTETIZAR,
EN CONSECUENCIA, ALGÚN FACTOR QUE INICIARA LA DIVISIÓN
DE LAS CÉLULAS B. EL MITÓGENO DE LA FITOLACA PHYTOLACCA
AMERICANA ESTIMULA TAMBIÉN LAS CÉLULAS B Y UN SUBCONJUN
TO DE CÉLULAS T DEL HUMANO Y DEL RATÓN.

ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS: (12,14).

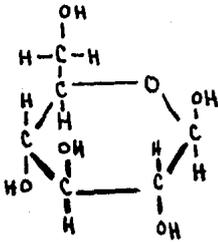
LA ACTIVACIÓN O ESTIMULO DE LOS LINFOCITOS SE
REFIERE A UNA CORRELACIÓN IN VITRO DE ALGÚN PROCESO
IN VIVO QUE REGULARMENTE OCURRE CUANDO EL ANTÍGENO REAC
CIONA DE MANERA RECÍPROCA CON LINFOCITO ESPECÍFICAMENTE
SENSIBILIZADOS EN EL HUÉSPED.

LA TRANSFORMACIÓN LINFOCITARIA ES UNA EXPRESIÓN CASI
SINÓNIMA USADA POR NOWEL EN 1960 Y POSTERIORMENTE POR
HIRSCHHORN Y OTROS, PARA DESCRIBIR LOS CAMBIOS MORFOLÓ
GICOS QUE RESULTABAN CUANDO LOS LINFOCITOS PEQUEÑOS EN
REPOSO ERAN TRANSFORMADOS EN LINFOBLASTOS AL SER EXPUES
TOS AL MITÓGENO FITOHEMAGLUTININA (PHA). LA BLASTOGÉNESIS
SE REFIERE AL PROCESO DE FORMACIÓN DE CÉLULAS PIRONINO
FÍLICAS SEMEJANTES A BLASTOS, EN CULTIVOS DE LINFOCITOS,
ESTIMULADOS POR ANTÍGENOS O MITÓGENOS INESPECÍFICOS.

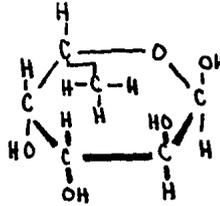
LA ACTIVACIÓN LINFOCITARIA ES UNA TÉCNICA IN VITRO COMÚNMENTE EMPLEADA PARA EVALUAR LA INMUNIDAD CELULAR EN LOS ENFERMOS CON INMUNODEFICIENCIA, AUTOINMUNIDAD, ENFERMEDAD INFECCIOSA Y CÁNCER.

ÉSTOS EVENTOS INCLUYEN FENÓMENOS RELACIONADOS CON LA MEMBRANA COMO EL AUMENTO DE SÍNTESIS DE LOS FOSFOLÍPIDOS, AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD A LOS CATIONES DIVALENTES, ACTIVACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA Y ELEVACIÓN RESULTANTE DEL AMP_C INTRACELULAR. LA SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS, DEL R N A Y FINALMENTE DEL D N A, OCURRE POCO TIEMPO DESPUÉS. EN ESTE ÚLTIMO FENÓMENO, EL AUMENTO DE LA SÍNTESIS DE D N A, EL QUE FINALMENTE DA POR RESULTADOS LA DIVISIÓN CELULAR Y CONSTITUYE LA BASE PARA LOS ANÁLISIS CLÍNICOS MÁS PERTINENTES PARA LA ACTIVACIÓN LINFOCITARIA (36,38).

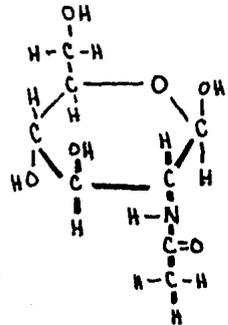
FIGURA No.1



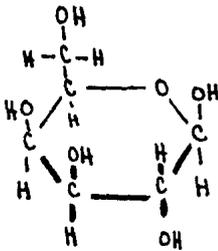
D-GLUCOSA



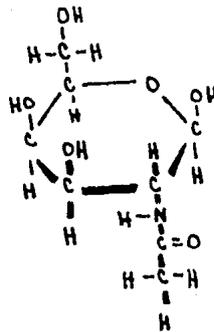
L-FUCOSA



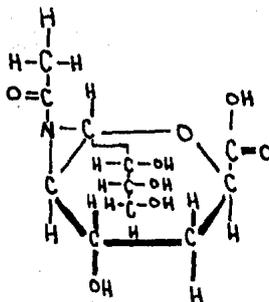
N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA



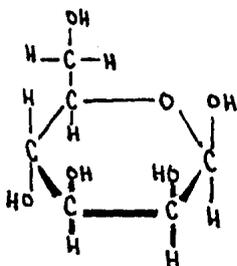
D-GALACTOSA



N-ACETIL-D-GALACTOSAMINA



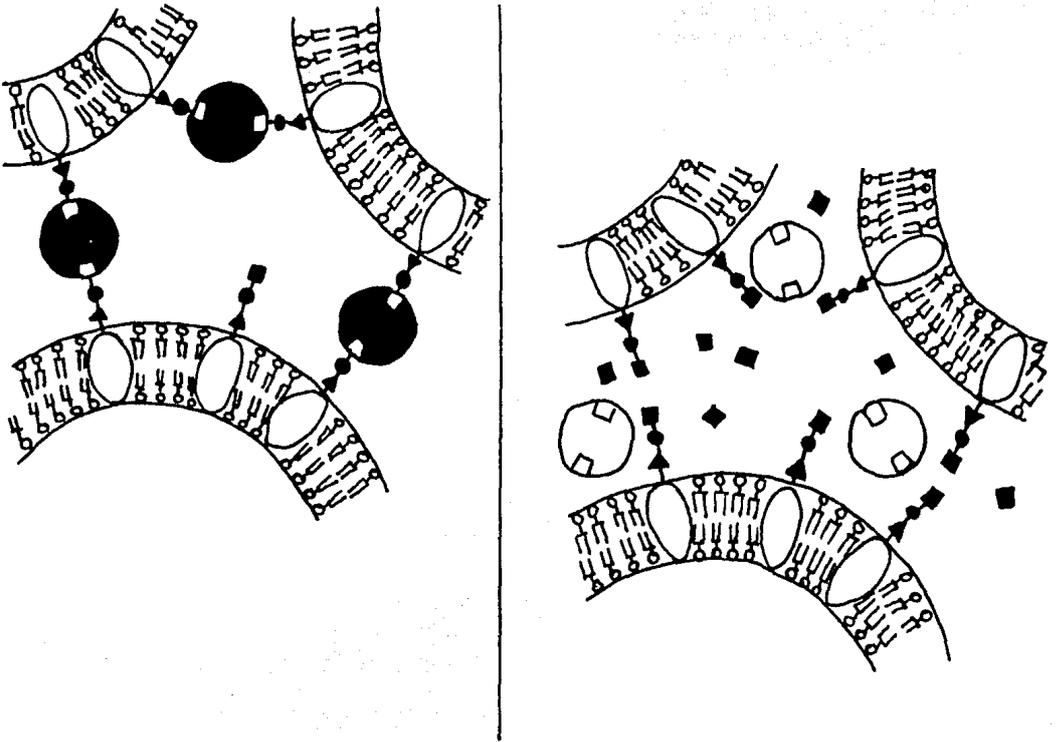
ACIDO-N-ACETILNEURAMINICO



D-MANOSA

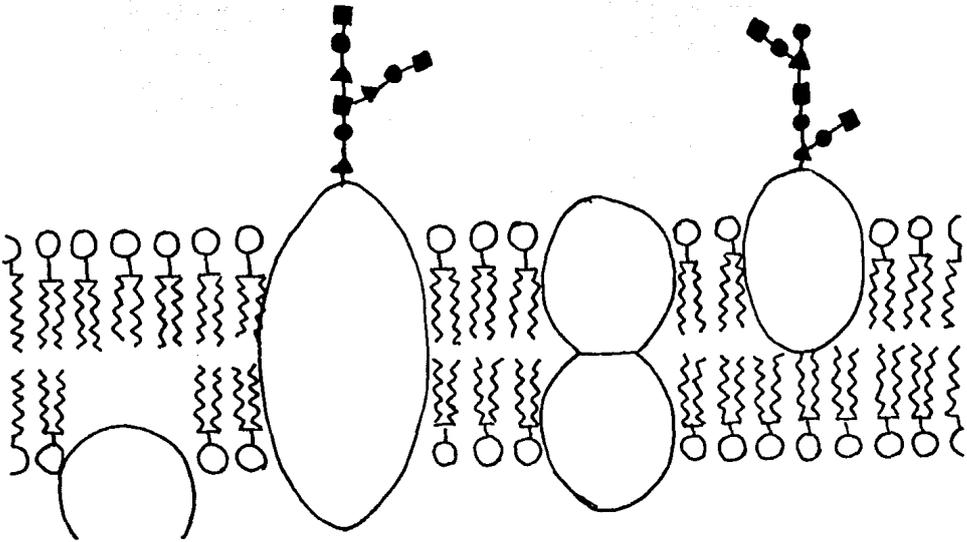
EN LA FIGURA No.1 SE REPRESENTA EN FORMA ESQUEMÁTICA, SEIS MONOSACÁRIDOS O UNIDADES GLUCOSÍDICAS, QUE SE EN CUENTRAN CORRIENTEMENTE EN LAS MEMBRANAS EXTERNAS DE LAS CÉLULAS ANIMALES, ESTÁN REPRESENTADAS AQUÍ, A PARTIR DE LA LGUCOSA EL ORGANISMO PUEDE SINTETIZAR ESTOS SEIS AZÚCARES. SU ESTRUCTURA CENTRAL ES LA DEL ANILLO PIRANO SA, DE CINCO ÁTOMOS DE CARBONO, AL QUE SE UNEN GRUPOS HIDRÓXILO (OH), D Y L INDICAN LA ORIENTACIÓN ESPACIAL (34).

FIGURA No.2



EN LA FIGURA No.2 SE MUESTRA QUE LA AGLUTINACIÓN ES EL RESULTADO DE UNIONES INTERCELULARES PROVOCADAS POR LECTINAS (GRIS OSCURO) QUE SE UNEN A RECEPTORES ESPECÍFICOS: LAS UNIDADES GLUCOSÍDICAS DE OLIGOSACÁRIDOS QUE SOBRESALEN DE LA SUPERFICIE CELULAR (IZQUIERDA). LA AGLUTINACIÓN SE INHIBE O SE IMPIDE SI A LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS SE AÑADE EL MONOSACÁRIDO RESPONSABLE DE LA UNIÓN, YA QUE OCUPA LOS LADOS DE UNIÓN DE LAS LECTINAS (DERECHA). (12).

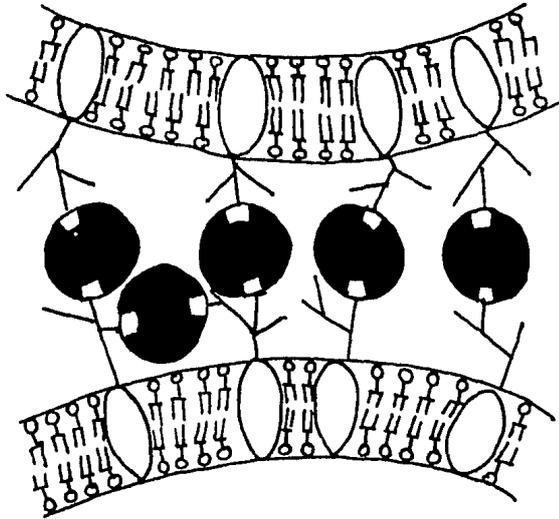
FIGURA No.3



EN LA FIGURA No.3 SE MUESTRA QUE LA MEMBRANA CELULAR ES UN ENSAMBLAJE DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS. EL ARMAZÓN ESTRUCTURAL LO CONSTITUYE UNA DOBLE CAPA DE MOLÉCULAS LIPÍDICAS, CADA UNA DE LAS CUALES PRESENTA UNA CABEZA HIDROSOLUBLE Y UNA DOBLE COLA HIDRÓFOBA. LAS MOLÉCULAS DE PROTEÍNA SE APOYAN SOBRE LA SUPERFICIE DE LA DOBLE CAPA O SE HALLAN EN SU SENO.

ALGUNAS DE LAS PROTEÍNAS SON GLUCOPROTEÍNAS, CON CADENAS RAMIFICADAS DE UNIDADES GLUCOSÍDICAS (DE COLOR OSCURO) A LAS QUE PUEDEN UNIRSE DETERMINADAS LECTINAS. EN GENERAL, ALGUNOS DE LOS LÍPIDOS DE LA MEMBRANA SON GLUCOLÍPIDOS (NO SE PRESENTAN AQUÍ), Y EN TAL CASO SUS CADENAS DE AZÚCAR, QUE SOBRESALEN DE LA MEMBRANA, PARTICIPAN EN LA UNIÓN CON LAS LECTINAS (12,31).

FIGURA No.4



EN LA FIGURA No.4 SE ENCUENTRA REPRESENTADA: LA AGLUTINACIÓN SELECTIVA DE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS PARECE DEBERSE A UNA MAYOR DENSIDAD LOCAL DE LECTINAS EN LA SUPERFICIE DE DICHAS CÉLULAS.

EN LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS, LOS RECEPTORES DE LECTINAS SE ENCUENTRAN MÁS CERCA UNOS DE OTROS; ASÍ SE PUEDE FORMAR UN MAYOR NÚMERO DE PUENTES CRUZADOS EN UN ÁREA. LAS PRUEBAS DE LA REDISTRIBUCIÓN DE LAS UNIDAS SON DE MICROGRAFÍAS DE MOLÉCULAS MARCADAS (12).

FIGURA No.5, SE MUESTRA EL "CICLO CELULAR",

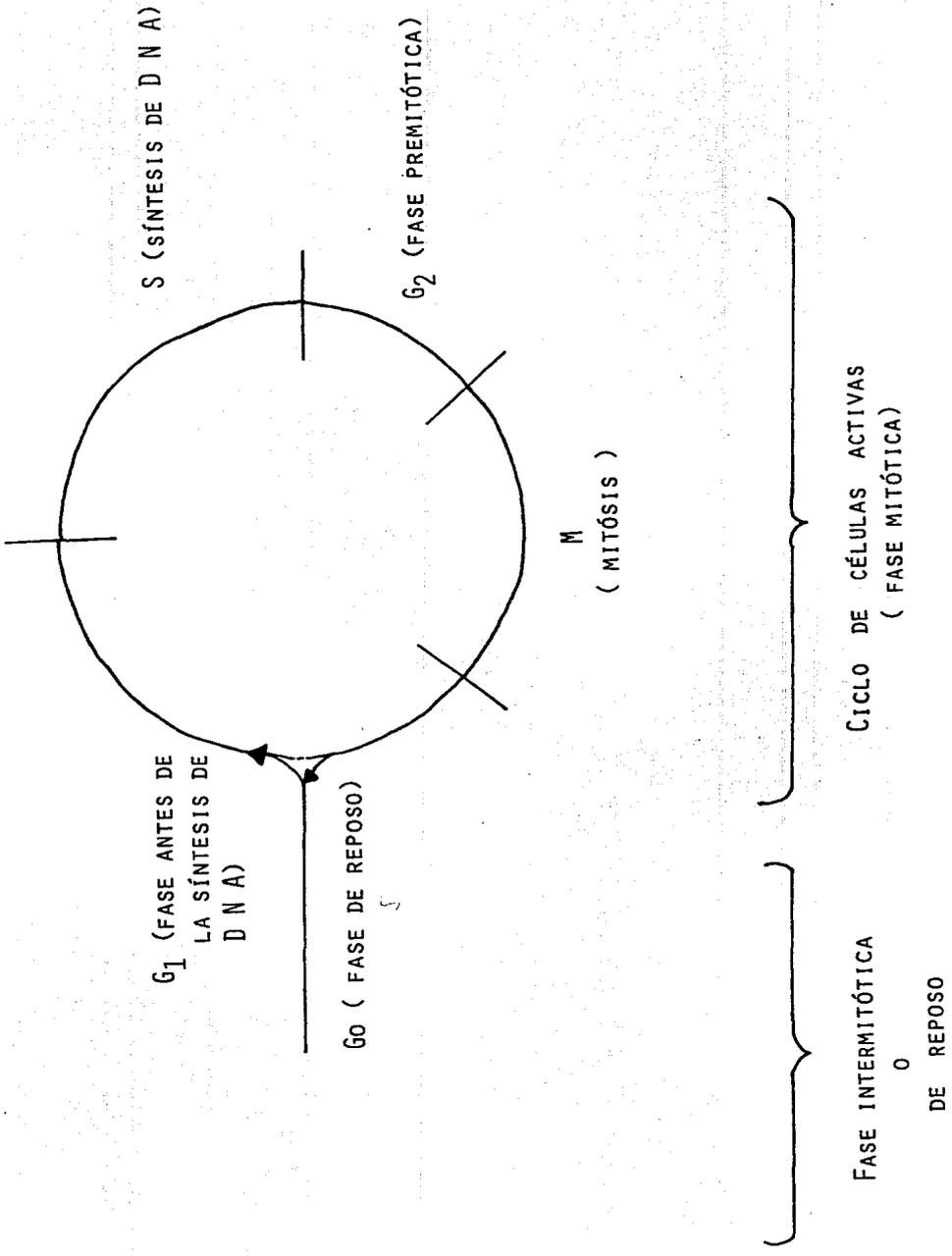
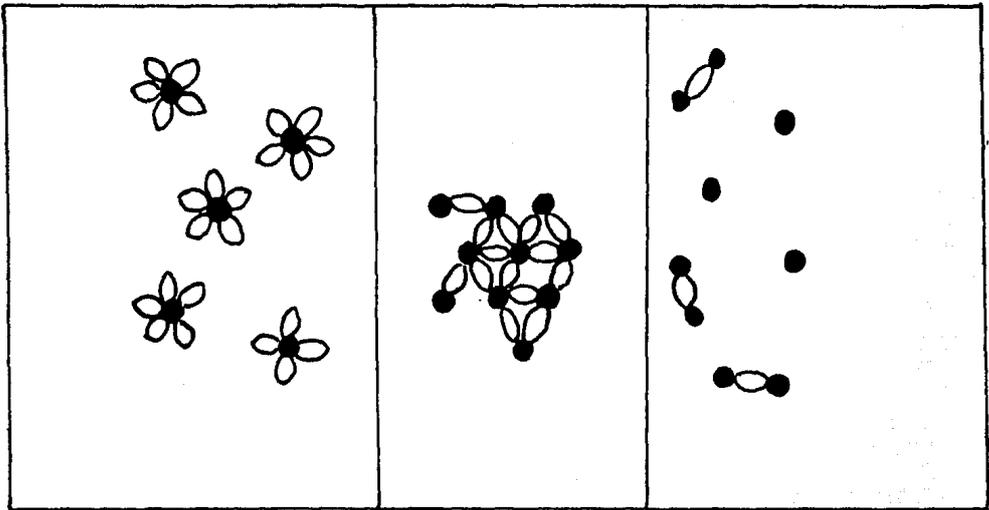


FIGURA No.6



A

B

C

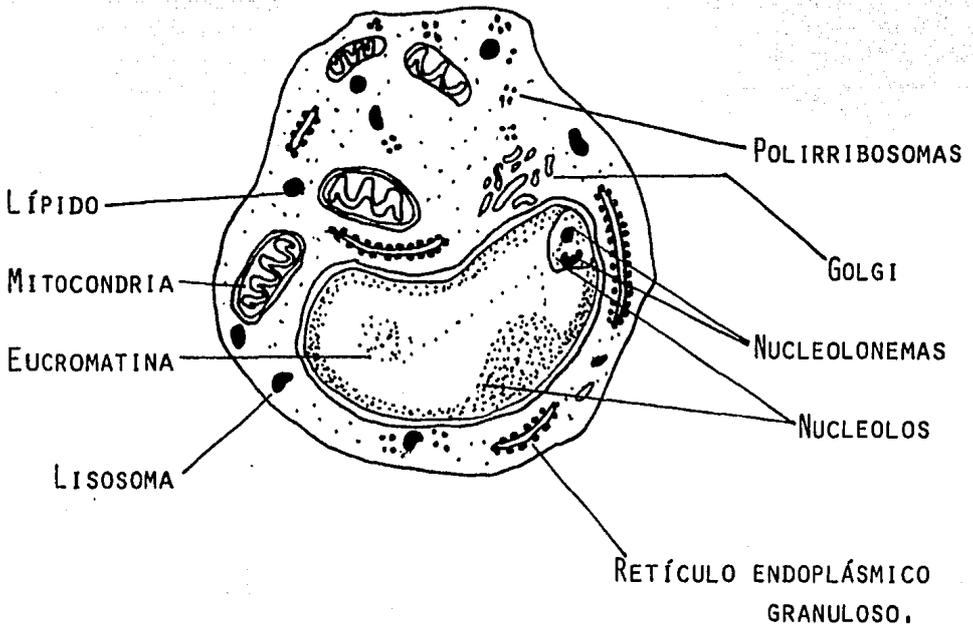
A. POSIBLE DISPOSICIÓN DE LOS ERITROCITOS (CÍRCULOS NEGROS) O DE CUALQUIER OTRO ANTÍGENO EN PARTÍCULAS CON EL ANTICUERPO (ÓVALOS) EN CONDICIONES DE EXCESO DE ANTICUERPO (12).

B. AGLUTINACIÓN MÁXIMA.

C. EXCESO DE ANTÍGENO.

FIGURA No.7

"REPRESENTACION DIAGRAMATICA DEL LINFOBLASTO (12)."



CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL:

EL MATERIAL BIOLÓGICO PARA EL ESTUDIO FUERON TRES ESPECIES DE PHASEOLUS QUE SE INDICAN A CONTINUACIÓN°

- 300g. DE SEMILLA DE FRIJOL PHASEOLUS, COCCINEUS, VARIEDAD AYOCOTE OBTENIDOS DE UN MERCADO SOBRE RUEDAS EN LA CIUDAD DE MÉXICO, D.F.

- 300g. DE SEMILLA DE FRIJOL PHASEOLUS, LUNATUS, INIA-CIAT-328-I.

- 300g. DE SEMILLA DE FRIJOL PHASEOLUS, VULGARIS, VARIEDAD CANARIO 107.

LAS DOS ÚLTIMAS MUESTRAS FUERON PROPORCIONADAS POR EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS (INIA) A TRAVES DEL DR. FRANCISCO, CARDENAS, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA.

METODOS:

A.-EXTRACCION DE LECTINAS A PARTIR DE LAS DIVERSAS ESPECIES DE FRIJOL.

1) OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PHASEOLUS.

LAS SEMILLAS QUEBRADAS PARCIALMENTE EN UN MORTERO SE MOLIERON EN UN MOLINO ARTHUR THOMAS DE LABORATORIO USANDO LA MALLA #40.

PESAR UN GRAMO DE FRIJOL MOLIDO AÑADIR 10 ML DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA, AGITAR DURANTE DOS HORAS CON MAGNETO, CENTRIFUGAR DURANTE 10 MINUTOS A 2 500 R.P.M. SE PARAR EL SOBRENADANTE Y EN EL SOBRENADANTE EFECTUAR LAS DETERMINACIONES DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.

A ESTA FRACCIÓN SE LE LLAMARÁ "EXTRACTO CRUDO",

2) EXTRACCIÓN DE LECTINAS.

SE PESAN 40G. DEL POLVO DE FRIJOL Y SE LE AGREGA 160 ML DE NaCl AL 5%, COLOCÁNDOSE ESTO EN UN VASO DE PRECIPITADO SE AJUSTA A PH 2 CON HCL CONC. PARA NO ALTERAR EL VOLUMEN INICIAL, ESTA MEZCLA SE AGITA DURANTE DOS HORAS EN UN AGITADOR MAGNÉTICO(COLOCAR ENTRE EL VASO DE PRECIPITADO Y LA PLANCHA MAGNETICA UNA TAPA DE CAJA PETRI PARA FORMAR UNA CÁMARA DE AIRE Y EVITAR QUE SE CALIENTE LA MUESTRA), TRANSCURRIDO ESTE TIEMPO SE CENTRIFUGA DURANTE 20 MINUTOS A 30 000G EN ULTRACENTRÍFUGA.

SE SEPARA EL SOBRENADANTE Y SE MIDE EN UNA PROBETA PARA CALCULAR LA CANTIDAD DE SULFATO DE AMONIO NECESARIO PARA PRECIPITAR Y SE TRASLADA A UN MATRAZ Erlenmeyer

(GUARDAR EN EL CONGELADOR UNA ALICUOTA DE ESTE SOBRENADANTE EL CUÁL SE DENOMINA "EXTRACTO CRUDO"). EL SOBRENADANTE RESTANTE SE LE AGREGA SULFATO DE AMONIO AL 60%, CON LA FINALIDAD DE PRECIPITAR LAS PROTEÍNAS PRESENTES, EL MATRAZ SE TAPA Y SE GUARDA EN EL REFRIGERADOR DURANTE TODA LA NOCHE. AL DÍA SIGUIENTE SE CENTRIFUGA DURANTE 20 MINUTOS A 20 000G EN ULTRACENTRÍFUGA, SE DESECHA EL SOBRENADANTE (GUARDAR UNA ALÍCUOTA DE ESTE SOBRENADANTE EN EL CONGELADOR AL CUÁL SE DENOMINA "SOBRENADANTE 1") PARA DETERMINAR PROTEÍNAS POSTERIORMENTE. EL BOTÓN SE RESUSPENDE EN UN MÍNIMO DE AGUA DESTILADA, SE COLOCA EN UNA MEMBRANA DE CELOFAN PARA DIALIZAR, SE HACEN DE 4 A 5 CAMBIOS DE AGUA DE LA LLAVE, LA DIÁLISIS SE ACELE RA MEDIANTE AGITACIÓN, POR LO QUE SE COLOCAN LAS BOLSAS DE DIÁLISIS EN MATRACES DE GRAN CAPACIDAD Y EN AGITACIÓN POR MEDIO DE UN MAGNETO, LOS ÚLTIMOS CAMBIOS DE AGUA SE LLEVAN A CABO CÓN AGUA DESTILADA, LOS CAMBIOS SE HACEN CADA HORA APROXIMADAMENTE.

AL TERMINAR LA DIÁLISIS, EL CONTENIDO DE LAS MEMBRANAS SE CENTRIFUGA DURANTE 30 MINUTOS A 2 500 R.P.M., EL BOTÓN SE DESECHA Y EL SOBRENADANTE SE TRANSFIERE A UN MATRAZ KITASATO, QUE SE TAPA CON TAPÓN DE HULE Y SE SELLA CON PAPEL PARAFILM. ÉSTA MUESTRA SE CRISTALIZA CON HIELO SECO Y ACETONA EN FORMA DE PELÍCULA EN TODO EL MATRAZ PARA FACILITAR LA LIOFILIZACIÓN DE DICHA MUESTRA. LA LIOFILIZACIÓN DURA APROXIMADAMENTE 24 HORAS.

LA MUESTRA YA LIOFILIZADA SE SACA DEL MATRAZ, RASPANDO PERFECTAMENTE LAS PAREDES DEL MATRAZ CON UNA ESPÁTULA Y LA MUESTRA SE COLOCA EN UN FRASCO DE VIDRIO PERFECTAMENTE LIMPIO Y SECO DE PESO CONOCIDO, SE COLOCA EN UN DESECADOR AL VACÍO AHÍ SE QUEDA LA MUESTRA DURANTE 24 HORAS Y EN EL CUARTO FRÍO PARA ASEGURAR QUE LA MUESTRA QUEDA PERFECTAMENTE SECA. TRANSCURRIDO ESTE TIEMPO SE SACA EL FRASCO QUE CONTIENE LA MUESTRA DEL DESECADOR Y SE PESA EN LA BALANZA ANALÍTICA Y ASÍ SE OBTIENE LA

CANTIDAD DE MUESTRA OBTENIDA. ÉSTE FRASCO SE TAPA, SE GUARDA EN EL DESECADOR EL CÚAL SE GUARDA EN EL CONGELADOR.

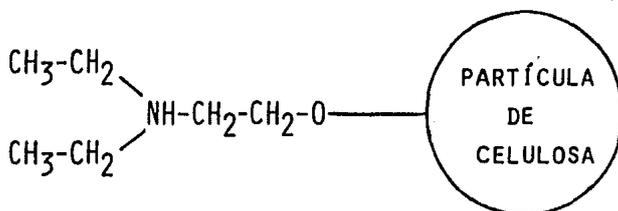
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

B.- SEPARACION CROMATOGRAFICA DE LAS LECTINAS (17,31).

FUE DESARROLLADO INICIALMENTE POR W.COHN (PARA AMINOÁCIDOS). EN ESTE MÉTODO LAS MOLÉCULAS DE SOLUTO SE SEPARAN BASÁNDOSE EN LAS DIFERENCIAS DE COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE. PARA ESTE PROCESO LA COLUMNA SE LLENA CON UNA RESINA SINTÉTICA QUE CONTIENE GRUPOS CARGADOS FIJOS. A MEDIDA QUE SE VARIA EL PH O LA CONCENTRACIÓN DE NaCl DEL MEDIO ELUYENTE ACUOSO, LAS PROTEÍNAS DESCENDEN EN LA COLUMNA A VELOCIDADES DIFERENTES DEPENDIENDO DE LA FUERZA CON QUE SE HAN UNIDO A LA RESINA Y PUEDEN RECOGERSE EN MUCHAS FRACCIONES PEQUEÑAS.

LOS MISMOS PRINCIPIOS BÁSICOS QUE HACEN POSIBLES LA SEPARACIÓN Y EL ANÁLISIS DE LAS MEZCLAS DE AMINOÁCIDOS O DE PÉPTIDOS MEDIANTE COLUMNAS DE RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO FUERON APLICADOS POR VEZ PRIMERA A LA SEPARACIÓN DE MEZCLAS DE PROTEÍNAS POR H.SOHER Y E.PETERSON EN LOS ESTADOS UNIDOS EN LA DÉCADA DE LOS AÑOS 50. LOS MATERIALES MÁS CORRIENTEMENTE USADOS PARA LA CROMATOGRAFÍA DE PROTEÍNAS SON DERIVADOS SINTÉTICOS DE LA CELULOSA. LA RESINA DENOMINADA DIETILAMINOETIL CELULOSA (DEAE-CELULOSA) CONTIENE GRUPOS CARGADOS POSITIVAMENTE A PH 7,0 Y POR LO TANTO ES UN INTERCAMBIADOR ANIÓNICO.

PARTÍCULA DE DIETILAMINOETIL-CELULOSA
(INTERCAMBIADOR ANIÓNICO)



CADA PARTÍCULA DE CELULOSA CONTIENE UN GRAN NÚMERO DE GRUPOS INTERCAMBIADORES DE IONES, QUE SE HALLAN UNIDOS COVALENTEMENTE A LOS GRUPOS HIDROXILO DE LA CELULOSA.

SE CONSIGUE LA RESOLUCIÓN DE LAS MEZCLAS DE PROTEÍNAS Y LA ELUCIÓN SUCESIVA DE LOS COMPONENTES INDIVIDUALES DE LAS COLUMNAS DE DEAE-CELULOSA, HACIENDO PASAR UNA SERIE DE DISOLUCIONES SALINAS DE FUERZA IÓNICA CRECIENTE, LAS CUALES PROVOCAN EL EFECTO DE DISMINUIR LAS UNIONES DE LAS PROTEÍNAS ANIÓNICAS. LA COMPOSICIÓN DE LA DISOLUCIÓN ELUYENTE, PUEDE VARIAR POCO A POCO Y DE MODO CONTINUO DURANTE LA CROMATOGRFÍA; ESTE PROCESO SE LLAMA ELUCIÓN DE GRADIENTE.

LOS GRADIENTES UTILIZADOS PARA ESTE OBJETO PUEDEN VARIAR LINEALMENTE CON EL VOLUMEN DE DISOLUCIÓN ELUYENTE O VARIAR EN ALGUNA OTRA RELACIÓN MEDIANTE EL EMPLEO DE SISTEMAS CAPACES DE MEZCLAR LÍQUIDOS EN PROPORCIONES VARIABLES.

LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN EL ELUÍDO, QUE SE RECOGE EN FRACCIONES PEQUEÑAS, SE VALORA ÓPTICAMENTE POR SU CAPACIDAD DE ABSORBER LA LUZ EN LA REGIÓN DEL ULTRAVIOLETA.

PUESTO QUE MUCHAS PROTEÍNAS CONTIENEN RESTOS DE TIROSINA, LAS MEDIDAS DE ABSORCIÓN DE LA LUZ A 280 NM, EN

UN ESPECTOFOTÓMETRO CONSTITUYEN UN MEDIO CONVENIENTE Y EXTREMADAMENTE RÁPIDO DE DETERMINAR EL CONTENIDO EN PROTEÍNA DE UNA DISOLUCIÓN.

1) ACTIVACIÓN Y MONTAJE DE LA COLUMNA.

SE EMPLEÓ DEAE-CELULOSA (PHARMACIA) SE HIDRATA CON AGUA DESTILADA Y SE PROCEDE A ACTIVARLA, LO CÚAL CONSISTE EN HACER LAVADOS CON DIVERSAS SOLUCIONES LOS CUALES SE REALIZAN DE LA SIGUIENTE MANERA SE COLOCA LA DEAE-CELULOSA EN UN EMBUDO DE FILTRACIÓN RÁPIDA DE TALLO CORTO, EL CÚAL CONTIENE PAPEL FILTRO DE PORO ABIERTO Y PARA RECIBIR EL FILTRADO SE COLOCA UN MATRAZ ERLNMEYER DE 2 000 ML, AL HACER PASAR LAS SOLUCIONES PARA ACTIVAR LA CELULOSA SE AGITA CON CUIDADO, CON UN AGITADOR DE VIDRIO, PARA QUE TODA LA DEAE-CELULOSA ENTRE EN CONTACTO MÁS FACILMENTE CON LAS SOLUCIONES.

PRIMERAMENTE SE HACE PASAR UNA SOLUCIÓN DE 0.25N NaOH-0.25N NaCl APROXIMADAMENTE UNOS 200 ML, HASTA OBTENER EN EL LÍQUIDO FILTRADO UN PH ALCALINO. SE LAVA CON AGUA DESTILADA HASTA QUE DESAPAREZCA EL PH ALCALINO. EN SEGUIDA DE ESTO SE HACEN PASAR UNOS 200 ML DE UNA SOLUCIÓN DE 0.25N HCL-0.25N NaCl HASTA OBTENER PH ÁCIDO, SE LAVA CON AGUA DESTILADA HASTA ELIMINAR LA ACIDEZ, DESPUÉS SE HACE PASAR UNA SOLUCIÓN DE ACETATO DE AMONIO 0.1N Y POR ÚLTIMO SE PASA 0.01N DE LA MISMA SOLUCIÓN Y AL FINAL SE PASA SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATO DE SODIO 0.02M PH 6.8 (17,27).

ESTE PROCEDIMIENTO SE LLEVA A CABO CUANDO ES LA PRIMERA VEZ QUE SE VA A USAR LA DEAE-CELULOSA.

POSTERIORMENTE CADA VEZ QUE SE USO LA DEAE-CELULOSA, SE DEBE DE ACTIVAR DE IGUAL MODO, CON LA DIFERENCIA DE QUE AL DESEMPACAR LA DEAE-CELULOSA DE LA COLUMNA SE HACE

PRIMERAMENTE UN LAVADO CON UNA SOLUCIÓN DE NaCl 1N, PH 6.8 Y SE PROCEDE A SEGUIR LA METODOLOGÍA DESCRITA ANTERIORMENTE, PERO SE ELIMINAN LOS LAVADOS CON ACETATO DE AMONIO 0.1N Y 0.01N.

PARA MONTAR LA COLUMNA LA DEAE-CELULOSA EN LA COLUMNA SE NECESITA QUE ÉSTA SE ENCUENTRE PERFECTAMENTE LIMPIA Y ENJUAGADA CON SOLUCIÓN BUFFER DE FOSFATO DE SODIO PH 6.8, 0.02M.

LAS DIMENSIONES DE LA COLUMNA DE VIDRIO EMPLEADA FUERON (2.0 x 60.0), PRIMERAMENTE SE COLOCA LANA DE VIDRIO EN LA COLUMNA Y SE LE AGREGA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS HASTA LA MITAD DE LA CAPACIDAD TOTAL DE LA COLUMNA, SE VA AGREGANDO LA DEAE-CELULOSA LA CUAL DEBE ESTAR PERFECTAMENTE HOMOGENIZADA, SE ABRE LA LLAVE DE LA COLUMNA, PARA QUE VAYA SALIENDO EL BUFFER POR GOTEO Y SE VAYA ASENTANDO LA DEAE-CELULOSA HASTA LLENAR LA COLUMNA A LA ALTURA DESEADA, SE DEBE TENER CUIDADO DE QUE NO SE FORMEN BURBUJAS O SE FRACCIONE LA DEAE-CELULOSA EMPACADA, YA QUE SI ESTO OCURRE, DEBERÁ SACARSE LA DEAE-CELULOSA Y VOLVER A EMPACARLA, LA DEAE-CELULOSA YA MONTADA DEBE ESTAR CON SUFICIENTE LÍQUIDO PARA QUE LO ANTERIOR NO SUCEDA, PARA QUE SE EMPAQUE PERFECTAMENTE, SE LE HACE PASAR UNA SOLUCIÓN DE BUFFER POR GOTEO.

C.- COLOCACION DE LA MUESTRA Y RECOLECCION DE FRACCIONES (17,26).

PESAR 50MG. DE MUESTRA LIOFILIZADA Y DISOLVERLA EN 3 ML DE BUFFER HASTA QUE ESTE PERFECTAMENTE DISUELTA Y SE COLOCA EN LA COLUMNA, QUE SE ENCUENTRA CONECTADA AL RECOLECTOR DE FRACCIONES, EN EL CUAL SE ENCUENTRAN 180 TUBOS CADA 30 TUBOS SE CAMBIA LA SOLUCIÓN QUE SE LES HACE PASAR; A LOS PRIMEROS 30 TUBOS SE LES HACE PASAR UNA SOLUCIÓN DE BUFFER 0.02M, PH 6.8 A LOS 30 TUBOS SIGUIENTES SE LES HACE PASAR UNA SOLUCIÓN DE NaCl 0.1N Y ASÍ

CADA 30 TUBOS SE SAMBIA A LAS SIGUIENTES SOLUCIONES 0,2N, 0,3N, 0,4N Y 0,5N, ESTO SE HACE CON LA FINALIDAD DE IR SEPARANDO LAS DIFERENTES PROTEÍNAS DEBIDO A QUE SE VARÍA LA FUERZA IÓNICA; SE AJUSTA EL GOTEJO A 60 GOTAS POR TUBO, CAYENDO DE 20-25 GOTAS POR MINUTO.

LOS 180 TUBOS DEBEN RECOLECTARSE EL MISMO DÍA, SE COLOCAN LOS TUBOS EN GRADILLAS SE TAPAN Y SE GUARDAN EN EL REFRIGERADOR, PARA PROCEDER A REALIZAR LAS LECTURAS AL DÍA SIGUIENTE O SI ES POSIBLE EL MISMO DÍA.

SE REALIZAN LAS LECTURAS EN EL ESPECTOFOTÓMETRO ZEIS CON FILTRO ULTRAVIOLETA A 280 NM, SE USAN CELDAS DE CUARZO COMO BLANCO SE USA EL BUFFER DE FOSFATOS 0,02M, PH 6,8,

GRAFICAR CADA FRACCIÓN CONTRA ABSORBANCIA,

D.-DETERMINACION DE PROTEINA.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES: BASADO EN LA FORMACIÓN DE UN COMPLEJO DE CU, NA Y K CON EL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU (18).

PARA REALIZAR LA CURVA PATRÓN, SE USA ALBÚMINA BOVINA A UNA CONCENTRACIÓN DE 350 μ G/ML, EN 10 TUBOS DE ENSAYE SE COLOCA DE MANERA CRECIENTE LA MUESTRA QUE VA DE 0,1 ML HASTA 1,0 ML (PARA LAS MUESTRAS PROBLEMA SE COLOCAN 0,5 ML DE MUESTRA, EXCEPTO DEL EXTRACTO CRUDO Y DEL SOBRENADANTE 1 YA QUE AQUÍ SE TOMA 0,1 ML DE MUESTRA).

- ALÍCUOTAS POR DUPLICADO DE 0,1 ML DE MUESTRA EN TUBOS DE ENSAYE DE 15 ML.
- SE DILUYE CON 0,9 ML DE AGUA DESTILADA PARA TENER UN VOLUMEN FINAL DE 1,0 ML.
- SE AGREGA 0,9 ML DEL REACTIVO A A CADA TUBO.
- SE INCUBA DURANTE 10 MINUTOS A 50°C Y SE DEJA ENFRIAR DURANTE 12 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE.
- SE AÑADE 0,1 ML DEL REACTIVO B Y SE DEJA REPOSAR DURANTE 10 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE.
- SE AÑADEN 3 ML DEL REACTIVO C, SE INCUBA DURANTE 5 MINUTOS A 50°C SE AGITAN Y SE DEJAN ENFRIAR A TEMPERATURA AMBIENTE.
- SE REALIZAN LAS LECTURAS EN UN ESPECTOFOTÓMETRO COLEMAN MODELO G-35 A 500 NM.

EL REACTIVO A SE ENCUENTRA FORMADO DE LOS SIGUIENTES COMPONENTES:

TARTRATO DE SODIO Y POTASIO ($\text{KNAC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g.
CARBONATO DE SODIO ANHIDRO	100.0 g.
HIDRÓXIDO DE SODIO 1M	500 ML.
AFORAR A 1 LITRO CON AGUA DESTILADA.	

EL REACTIVO B SE ENCUENTRA FORMADO DE LOS SIGUIENTES COMPONENTES:

TARTRATO DE SODIO Y POTASIO ($\text{KNAC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2.0 g.
SULFATO DE COBRE PENTAHIDRATADO	1.0 g.
HIDRÓXIDO DE SODIO 1M	10 ML.
AGUA DESTILADA	90 ML.

EL REACTIVO C:

REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU (MERK, MÉX)	1.0 ML.
AGUA DESTILADA	15.0 ML.

E.-DETERMINACION DE HEMAGLUTININAS, TECNICA DE JAFFE (26,27).

SE DESFIBRINAN 10 ML DE SANGRE DE LA ESPECIE SELECCIONADA Y SE LAVA POR TRES VECES CON TRES VOLUMENES IGUALES AL DE LA SANGRE, DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA, SE CENTRIFUGA DURANTE 10 MINUTOS A 2 500 R.P.M. ESTO SE REPITE HASTA OBTENER SOBRENADANTE LIMPIO. ÉSTO TIENE POR OBJETO ELIMINAR ERITROCITOS HEMOLIZADOS Y OTROS COMPONENTES DE LA SANGRE QUE NO SEAN ERITROCITOS.

UNA VEZ LAVADA, SE DILUYE AL 4% CON SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA 1:24 ML Y SE AÑADE 1 ML DE TRIPSINA AL 0.1% POR CADA 9 ML DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA Y SE INCUBA A 37°C, DURANTE 60 MINUTOS.

SE LAVA TRES VECES HASTA QUITAR EL EXCESO DE TRIPSINA Y SE RESUSPENDE EN EL MISMO VOLUMEN ORIGINAL Y SE HACEN LAS DETERMINACIONES.

MANERA DE EFECTUAR LA REACCIÓN:

SE UTILIZA PARA ESTA DETERMINACIÓN PLACAS Y MICROTI-
TULADORES: APARATO DE MICRO-TITER (COOK ENG. ALEXANDRIA
VIRGINIA U.S.A).

COLOCAR EN CADA POZO DE LA MICROPLACA, 0,05 ML DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA, EVITANDO QUE ESTA SOLUCIÓN TOQUE LAS PAREDES DEL POZO, AGREGAR 0,05 ML DEL EXTRACTO FINAL DE LA MUESTRA DEL PRIMER POZO, AGITAR Y DE ESTE POZO TOMAR UNA ALICUOTA Y DILUIR CON EL MICROTITULADOR METÁLICO DE 0,05 ML, AGITANDO SUCEATIVAMENTE EN LOS POZOS SIGUIENTES, ADICIONAR A CADA UNO DE LOS POZOS 0,05 ML DE LA SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS ACTIVADOS, HOMOGENIZAR CON AYUDA DE UN AGITADOR , DEJAR REPOSAR 45 A 60 MINUTOS, COLOCAR LA MICROPLACA AL TRANSCURRIR EL TIEMPO SEÑALADO FRENTE A UNA FUENTE LUMINOSA Y CON UN PALILLO DE MADERA AGITAR, OBSERVANDO A SIMPLE VISTA SI SE PRODUCE AGLUTINACIÓN ANTE UNA AGLUTINACIÓN LA PRUEBA SE CONSIDERA POSITIVA.

A TODOS LOS TUBOS CORRESPONDIENTES A LOS PICOS, EXTRACTOS, LIOFILIZADOS Y SOBRENADANTE 1 DE CADA ESPECIE DE FRIJOL SE LES DETERMINÓ HEMAGLUTININAS, PRIMERAMENTE CON SANGRE DE CONEJO, PARA SABER CUALES SON LAS MUESTRAS QUE NOS INTERESA SEGUIR ESTUDIANDO, YA QUE LAS MUESTRAS QUE DEN POSITIVA LA REACCIÓN CON LOS ERITROCITOS DE CONEJO QUE SON MÁS INESPECÍFICOS INDICAN QUE TIENEN CAPACIDAD HEMAGLUTINANTE Y ESTAS MUESTRAS SE GUARDAN Y LAS QUE DEN NEGATIVA LA PRUEBA SE DESECHAN.

LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN PRIMERO SE REALIZA CON SANGRE DE CONEJO TRIPSINIZADA YA QUE DE ESTA MANERA SE SENSIBILIZAN A LOS ERITROCITOS Y ASI SE FACILITA LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN, ADEMÁS LA SANGRE DE CONEJO NO TIENE ESPECIFICIDAD EN SUS RECEPTORES PARA CARBOHIDRATOS. DESPUÉS DE HABER REALIZADO ESTA PRUEBA, SE REPITE DE NUEVO PERO USANDO SANGRE HUMANA DE GRUPO A, B Y O PARA CONOCER QUÉ MUESTRA ES ESPECÍFICA PARA CADA RECEPTOR DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ERITROCITOS.

F.-CULTIVO DE LINFOCITOS (36).

LAS MUESTRAS SE TRABAJAN POR DUPLICADO, EN FRASCOS VIALES ESTÉRILES DE APROXIMADAMENTE 50 ML QUE CONTIENEN 5 ML DE MEDIO DE MCCOY 5A MODIFICADO, 12 GOTAS DE SANGRE TOTAL HEPARINIZADA Y HOMOGENIZADA, DOS GOTAS DE ANTIBIÓTICO QUE EN ESTE CASO SE USÓ PENICILINA CON AGUJA DEL #20 QUE EQUIVALEN A 0.1 ML, 0.25 ML DE FITOHEMAGLUTININA CON AGUJA DEL #20. AL TERMINAR SE FLAMEA LA BOCA DE LOS FRASCOS, HOMOGENIZANDO LOS CONSTITUYENTES Y SE INCUBAN EN OSCURIDAD DURANTE 36 Y 72 HORAS A 37°C. TODO ESTO SE REALIZA EN UNA CAMPANA ESTÉRIL.

G.-COSECHA DE LINFOCITOS (36).

A LAS 48 HORAS SE ADICIONA 0.4 ML DE COLCHICINA Y SE DEJAN ACTUAR DURANTE 30 MINUTOS A 37°C Y SE CENTRIFUGA DURANTE 10 MINUTOS A 1 500 R.P.M, SE DESECHA EL SOBRENADANTE Y SE ADICIONAN DE 5 A 10 ML DE SOLUCIÓN HIPOTÓNICA DE NaCl 0.75M RESUSPRIENDO EL BOTÓN CON UNA PIPETA PASTEUR, LA SOLUCIÓN HIPOTÓNICA DEBE ESTAR A TEMPERATURA DE 37°C, SE DEJA ACTUAR DURANTE 17 MINUTOS, SE CENTRIFUGA A 1 500 R.P.M, SE DESECHA EL SOBRENADANTE Y SE ADICIONA 5 ML DE UNA SOLUCIÓN FIJADORA DE ÁCIDO-ALCOHOL METÁLICO 1:3 SE RESUSPENDE EL BOTÓN Y SE CENTRIFUGA DURANTE 10 MINUTOS A 1 500 R.P.M, SE DESECHA EL SOBRENADANTE, SE AGREGA MÁS SOLUCIÓN FIJADORA Y SE LAVA VARIAS VECES HASTA QUE EL BOTÓN QUEDE BLANCO.

H.-PREPARACION DE LAMINILLAS (36).

EL BOTÓN SE RESUSPENDE EN 0,5 ML DE SOLUCIÓN FIJADORA Y EN LÁMINAS BIEN LAVADAS Y DESENGRASADAS SE DEJAN CAER TRES GOTAS DE LA SOLUCIÓN ANTERIOR A UNA ALTURA APROXIMADAMENTE DE 20 CM SE SOPLA Y SE FIJA A LA FLAMA UNOS SEGUNDOS, SE DEJA ENFRIAR Y SE LAVAN CON AGUA DESIONIZADA, SE INTRODUCEN A UN COLORANTE DE GIEMSA DURANTE TRES MINUTOS Y MEDIO, EL CUAL ESTÁ HECHO DE UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS DE SODIO Y POTASIO 0,025 M A PH 6,8, SE PROCEDE A REALIZAR LAS LECTURAS DE LAS LAMINILLAS.

CONTAR 3 000 CÉLULAS POR PREPARACIÓN.

INDICE MITOTICO = No. DE MITÓISIS X CAMPO (1000 CÉLULAS).

LAS LECTURAS SE REALIZAN UTILIZANDO UN MICROSCOPIO CON EL OBJETIVO DE SECO DÉBIL Y CON AYUDA DE UN CONTADOR DE CÉLULAS.

RESULTADOS:

SEPARACION CROMATOGRAFICA EN DEAE-CELULOSA DE LAS PROTEINAS.

SE PARTIÓ DE 40 G. DE FRIJOL, AL EMPEZAR A TRABAJAR EN LA EXTRACCIÓN DE LAS LECTINAS DE LAS TRES ESPECIES DE PHASEOLUS.

A PARTIR DE LA CANTIDAD ANTERIOR PARA P. COCCINEUS SE OBTUVO 0.555 G. DE LIOFILIZADO TOTAL DEL CUAL SE USABA 0.050 G. CADA VEZ QUE SE METIÓ EN LA COLUMNA Y PARA ESTA MUESTRA SE REALIZARON SIETE CORRIDAS, DE ESTAS CORRIDAS INTERESARON LOS PICOS I Y II YA QUE DIERON REACCIÓN POSITIVA CON SANGRE DE CONEJO, LOS CUALES SE DIALIZARON Y LIOFILIZARON OBTENIÉNDOSE DE ESTOS LAS SIGUIENTES CANTIDADES:

Pico I 0.068 g.

Pico II 0.062 g.

HAY QUE TOMAR EN CUENTA QUE ESTA CANTIDAD ES LA SUMA DE LAS SIETE CORRIDAS.

PARA P. LUNATUS SE OBTUVO 2.037 G. DE LIOFILIZADO TOTAL DEL CUAL SE USABA 0.050 G. PARA REALIZAR UNA CORRIDA Y SE LLEVARON A CABO CINCO CORRIDAS DE LAS CUALES SE RECOLECTARON LOS PICOS II Y III DE LA PRIMERA A LA QUINTA CORRIDA, DESPUÉS DE DIALIZAR Y LIOFILIZAR ÉSTOS SE OBTUVIERON LAS SIGUIENTES CANTIDADES:

Pico II 0.042 g.

Pico III 0.209 g.

PARA P.VULGARIS, SE OBTUVO 2.231 g. DE LIOFILIZADO TOTAL DEL CUAL SE USABA 0.050 g. PARA REALIZAR UNA CORRIDA LLEVANDOSE A CABO EN ESTE CASO SIETE CORRIDAS DE LAS CUALES SE RECOLECTARON LOS PICOS I Y II DE LA PRIMERA A LA SÉPTIMA CORRIDA, DESPUÉS DE DIALIZAR Y LIOFILIZAR ESTOS PICOS SE OBTUVIERON LAS SIGUIENTES CANTIDADES:

Pico I 0.101 g.

Pico II 0.1332 g.

DEL FRIJOL PHASEOLUS.COCCINEUS SE HICIERON SIETE CORRIDAS Y AL GRAFICAR No. DE FRACCIÓN CONTRA ABSORBANCIA SE OBSERVA LA PRESENCIA DE CINCO PICOS COMO SE MUESTRA EN LA GRÁFICA No.1 LOS CUALES SE SEPARARON Y SE GUARDARON EN MATRACES ERLLENMEYER TAPADOS EN EL CONGELADOR.

DEL FRIJOL PHASEOLUS.LUNATUS SE REALIZARON CINCO CORRIDAS Y SE OBSERVARON CUATRO PICOS COMO SE MUESTRA EN LA GRÁFICA No.2 , LOS CUALES SE SEPARARON Y SE GUARDARON EN MATRACES ERLLENMEYER TAPADOS EN EL CONGELADOR.

DEL FRIJOL PHASEOLUS.VULGARIS SE REALIZARON SIETE CORRIDAS OBSERVÁNDOSE CUATRO PICOS COMO SE MUESTRA EN LA GRÁFICA No.3, LOS CUALES SE SEPARARON Y SE GUARDARON AL IGUAL QUE LOS ANTERIORES.

LOS TUBOS CORRESPONDIENTES A CADA PICO SE LES DENOMINAN MUESTRAS PROBLEMA Y DE LOS CUALES SE TOMARON 0,5 ML DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

DETERMINACION DE PROTEINAS

EN LA GRÁFICA No.4 SE MUESTRA LA CURVA PATRÓN DE PROTEÍNAS LA CUAL NOS SIRVE PARA INTERPOLAR EN ELLA LAS MUESTRAS PROBLEMA Y ASÍ CONOCER LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA QUE SE ENCUENTRA EN LA MUESTRA. SE PUEDE VER QUE HAY LINEARIDAD ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE MICROGRAMOS DE PROTEÍNAS Y LAS MUESTRAS YA QUE SE AJUSTARON PARA QUE QUEDARAN DENTRO DENTRO DE ESTOS LÍMITES.

PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS DE LOS EXTRACTOS CRUDOS Y LIOFILIZADOS, POR SU ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA SE TOMÓ UNA ALÍCUOTA DE 0.1 ML PARA LA DETERMINACIÓN. ESTO SE TOMÓ EN CUENTA PARA HACER LAS CORRECCIONES DE LOS RESULTADOS.

EN EL "SOBRENADANTE 1" SE DETERMINÓ PROTEÍNAS SOLAMENTE PARA CONOCER SI LA PRECIPITACIÓN DE LAS MISMAS HABÍA SIDO COMPLETA.

EN LA TABLA 1 SE PRESENTAN ESTOS RESULTADOS.

ES IMPORTANTE MENCIONAR QUE CADA MATRAZ DEBE ESTAR PERFECTAMENTE ETIQUETADO MENCIONANDO: ESPECIE DE FRIJOL, NÚMERO DE CORRIDA, NÚMERO DE PICO Y FECHA.

DESPUÉS DE HABER REALIZADO LAS DETERMINACIONES DE PROTEÍNA Y DE CAPACIDAD HEMAGLUTINANTE DE TODAS LAS MUESTRAS Y DE HABER OBTENIDO LOS RESULTADOS, SE HACE UNA SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS QUE DIERON RESULTADOS SATISFACTORIOS, Y SE PROCEDE A AGRUPAR EN UN SOLO MATRAZ TODAS LAS MUESTRAS QUE SON IGUALES PARA MÁS TARDE DIALIZARLAS Y LIOFILIZARLAS.

TENIENDO YA TODAS LAS MUESTRAS DIALIZADAS Y LIOFILIZADAS, SE PROCEDIÓ A DETERMINAR PROTEÍNA Y CAPACIDAD HEMAGLUTINANTE, LO CÚAL SE ESPERA QUE AUMENTEN LOS VALORES DEBIDO A SU PURIFICACIÓN, LOS VALORES DE PROTEÍNA SE DAN EN MG/ML Y YA TENIENDO ESTOS RESULTADOS SE PUEDE CALCULAR LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA LO CÚAL DA UNA IDEA MÁS

CLARA DEL PODER AGLUTINANTE DE LAS MUESTRAS O DICHO DE OTRA MANERA QUÉ TAN ACTIVA ES LA LECTINA CON LA CUAL SE ESTA TRABAJANDO, ASÍ COMO TAMBIÉN INDICA QUE TAN BIEN SE REALIZÓ LA PURIFICACIÓN DE ÉSTA, CON LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA SE REALIZA LA COMPARACIÓN ENTRE CADA ESPECIE DE FRIJOL QUE SE TRABAJO, ASÍ COMO DE LAS FRACCIONES DE ESTOS CONOCIENDO CUALES SON LOS QUE TIENEN MEJOR ACTIVIDAD.

TABLA 1

VALORES DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES REUNIDAS DE PHASEOLUS COCCINEUS, DE LA SEGUNDA A LA SEPTIMA CORRIDA.

	Abs.	MG/ML	MG. PROT. /G. DE TOTAL LIOF.
EXTRACTO CRUDO	0.04	2.400	-
SOBRENADANTE 1 (RESULTANTE DE LA PRECIPITACIÓN)	0.07	0.415	-
LIOFILIZADO TOTAL	0.14	0.940	940

EN LA PRIMERA CORRIDA QUE SE REALIZÓ DE PHASEOLUS COCCINEUS, SE METIERON 0.5 G. DE MUESTRA DE LIOFILIZADO EN LA COLUMNA CON LA FINALIDAD DE TENER "UNA MUESTRA DE TANTEO" Y VER MÁS CLARAMENTE LOS PICOS QUE SE ESPERABAN OBTENER QUE PERFIL TENIAN, AL OBTENER LOS RESULTADOS SE VIÓ QUE ESTABA MUY CONCENTRADA LA MUESTRA POR LO QUE SE BAJÓ LA CANTIDAD QUE SE METERÍA EN LA COLUMNA PARA OBTENER UN PERFIL MEJOR Y UNA SEPARACIÓN MÁS CLARA DE LOS PICOS OBTENIDOS POR LO QUE DE LA SEGUNDA A LA SÉPTIMA CORRIDA SE METIÓ 0,050 G. DE MUESTRA DE LIOFILIZADO EN LA COLUMNA. POR LO QUE AL ANALIZAR LOS RESULTADOS DE CANTIDAD PROTEÍNA ENCONTRADA EN LAS FRACCIONES DE LA CORRIDA UNO SE OBSERVA SU ALTO CONTENIDO EN PROTEÍNA.

POR ESTA RAZÓN NO SE TOMÓ EN CUENTA PARA LOS RESULTADOS FINALES ESTA "CORRIDA DE TANTEO".

CORRIDA DE TANTEO: "CORRIDA No.1"CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	25-45	0.13	0.940
Pico II	60-80	0.08	0.480
Pico III	95-110	0.095	0.580
Pico IV	120-130	0.015	0.120
Pico V	150-160	0	0

CORRIDA No.2CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	36-53	0.175	0.206
Pico II	73-86	0.145	0.172

(CONTINUA)

CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico III	89-94	0.035	0.050
Pico IV	106-115	0.135	0.158
Pico V	130-140	0.085	0.100

CORRIDA No.3CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	30-45	0.29	0.220
Pico II	64-75	0.145	0.172
Pico III	93-101	0.175	0.208
Pico IV	103-107	0.075	0.088
Pico V	118-123	0.045	0.072

CORRIDA No.4CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	36-46	0.355	0.420
Pico II	71-79	0.215	0.252
Pico III	86-130	0.085	0.100

CORRIDA No.5CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	37-47	0.295	0.348
Pico II	73-86	0.175	0.208
Pico III	103-120	0.135	0.160
Pico IV	121-139	0.07	0.084

CORRIDA No.6CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	34-42	0.41	0.490
Pico II	70-83	0.145	0.172
Pico III	133-138	0.125	0.148

CORRIDA No.7CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	38-47	0.325	0.348
Pico II	72-81	0.215	0.252
Pico III	101-126	0.105	0.124
Pico IV	139-143	0.215	0.252

TABLA 2

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (ERITROCITOS TRIPSINIZADOS DE CONEJO).

MUESTRA (<u>PHASEULOS, COCCINEUS</u>):	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
EXTRACTO CRUDO	1:1024
SOBRENADANTE 1	1:256
LIOFILIZADO TOTAL	1:32

CORRIDA No.1

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:32
Pico II	1:32
Pico III	1:2
Pico IV	1:4
Pico V	1:2

CORRIDA No.2

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:32
Pico II	1:32
Pico III	1:2
Pico IV	-
Pico V	-

CORRIDA No.3

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:16
Pico II	1:16
Pico III	-
Pico IV	-
Pico V	-

CORRIDA No.4

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:16
Pico II	1:32
Pico III	1:2

CORRIDA No.5

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:16
Pico II	1:32
Pico III	-
Pico IV	-

CORRIDA No.6

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:32
Pico II	1:16
Pico III	-

CORRIDA No.7

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:32
Pico II	1:16
Pico III	-
Pico IV	-

DEBIDO A QUE ÚNICAMENTE LOS PICOS I Y II DIERON REACCIÓN POSITIVA DE AGLUTINACIÓN SOLAMENTE ESTOS DOS PICOS SE GUARDAN Y SE DESECHAN LOS DEMÁS YA QUE CARECEN DE CAPACIDAD HEMAGLUTINANTE.

TABLA 3

VALORES DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES REUNIDAS DE PHASEOLUS LUNATUS, DE LA PRIMERA A LA QUINTA CORRIDA.

	ABS.	MG/ML	MG. PROT./G. DE TOTAL L IOF.
EXTRACTO CRUDO	0.09	4,600	-
SOBRENADANTE 1 (RESULTANTE DE LA PRECIPITACIÓN)	-	-	-
LIOFILIZADO TOTAL	0.165	0.970	970

CORRIDA No. 1CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	43-67	0.07	0.072
Pico II	77-100	0.10	0.104

(CONTINUA)

CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	ABS.	MG/ML
Pico III	108-120	0.39	0.400
Pico IV	167-173	0.055	0.056

CORRIDA No.2CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	ABS.	MG/ML
Pico I	35-44	0.08	0.092
Pico II	73-90	0.17	0.172
Pico III	104-123	0.39	0.400
Pico IV	134-180	0.06	0.064

CORRIDA No.3CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	40-55	0.03	0.032
Pico II	78-89	0.13	0.132
Pico III	103-111	0.46	0.468

CORRIDA No.4CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	40-60	0.07	0.072
Pico II	76-100	0.11	0.112
Pico III	107-121	0.40	0.406
Pico IV	130-158	0.06	0.064

CORRIDA No.5CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	40-56	0.08	0.092
Pico II	74-92	0.17	0.172
Pico III	104-121	0.39	0.400
Pico IV	132-143	0.055	0.056

TABLA 4

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (ERITRICITOS TRIPSINIZADOS DE CONEJO).

MUESTRA (PHASEOLUS, LUNATUS):

PRUEBA NEGATIVA PARA TODAS LAS MUESTRAS.

TABLA 5

VALORES DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES REUNIDAS DE PHASEOLUS VULGARIS, DE LA PRIMERA A LA SEPTIMA CORRIDA.

	Abs.	MG/ML	MG. PROT. /G. DE TOTAL LIOF.
EXTRACTO CRUDO	0.115	5.600	-
SOBRENADANTE I (RESULTANTE DE LA PRECIPITACIÓN)	-	-	-
LIOFILIZADO TOTAL	0.16	0.960	960

CORRIDA No.1CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	41-49	0.155	0.156
Pico II	50-62	0.055	0.052
Pico III	72-80	0.28	0.292

(CONTINUA)

CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico IV	110-129	0,245	0,252
Pico V	125-143	0,34	0,344

CORRIDA No.2CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	40-56	0,13	0,132
Pico II	73-83	0,24	0,252
Pico III	114-128	0,235	0,240
Pico IV	132-138	0,35	0,368

CORRIDA No.3CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	40-50	0.105	0.108
Pico II	51-62	0.11	0.112
Pico III	70-91	0.18	0.184
Pico IV	110-130	0.27	0.280
Pico V	136-146	-	-

CORRIDA No.4CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	39-56	0.19	0.176
Pico II	74-85	0.205	0.220
Pico III	112-127	0.215	0.232
Pico IV	131-141	0.345	0.350

CORRIDA No.5CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	39-52	0.14	0.144
Pico II	70-82	0.185	0.192
Pico III	107-127	0.25	0.260
Pico IV	135-158	0.13	0.132

CORRIDA No.6CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	37-49	0.325	0.340
Pico II	71-86	0.16	0.164
Pico III	106-125	0.19	0.196
Pico IV	133-142	0.18	0.184

CORRIDA No.7CONTENIDO DE PROTEINA

FRACCION	TUBOS	Abs.	MG/ML
Pico I	39-55	0.22	0.228
Pico II	77-88	0.17	0.176
Pico III	94-125	0.165	0.172
Pico IV	135-150	0.145	0.148

TABLA 6

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (ERITROCITOS TRPSINIZADOS DE CONEJO).

MUESTRA (<u>PHASEOLUS, VULGARIS</u>)	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
EXTRACTO CRUDO	1:1024
SOBRENADANTE 1	1:128
LIOFILIZADO TOTAL	1:128

CORRIDA No.1

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:128
Pico II	1:64
Pico III	1:256
Pico IV	1:2
Pico V	-

CORRIDA No.2

Pico I	1:64
Pico II	1:64
Pico III	1:4
Pico IV	-

CORRIDA No.3

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:128
Pico II	1:128
Pico III	1:256
Pico IV	1:2

CORRIDA No.4

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:32
Pico II	1:64
Pico III	1:2
Pico IV	-

CORRIDA No.5

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:256
Pico II	1:64
Pico III	1:2
Pico IV	-

CORRIDA No.6

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:256
Pico II	1:32
Pico III	1:2
Pico IV	1:2

CORRIDA No.7

	<u>POZO</u> (DILUCIÓN)
Pico I	1:128
Pico II	1:32
Pico III	-
Pico IV	-

DEBIDO A QUE LOS PICOS I Y II DIERON REACCIÓN POSITIVA A MAYOR DILUCIÓN SOLAMENTE ÉSTOS SE GUARDARON PARA LAS SI
GUIENTES PRUEBAS.

TABLA 7

VALORES PROMEDIO DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES DE P. COCCINEUS
DE LA SEGUNDA A LA SEPTIMA CORRIDA.

CONTENIDO DE PROTEINA

<u>MUESTRA</u>	MG/ML
Pico I	0.345
Pico II	0.205
Pico III	0.132
Pico IV	0.145
Pico V	0.086

TABLA 8

VALORES PROMEDIO DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES DE
P. LUNATUS DE LA PRIMERA A LA QUINTA CORRIDA.

<u>MUESTRA</u>	<u>CONTENIDO DE PROTEINA</u> MG/ML
Pico I	0.072
Pico II	0.138
Pico III	0.415
Pico IV	0.060

TABLA 9

VALORES PROMEDIO DE PROTEINA DE LAS FRACCIONES DE
P. VULGARIS DE LA PRIMERA A LA SEPTIMA CORRIDA.

<u>MUESTRA</u>	<u>CONTENIDO DE PROTEINA</u>
	MG/ML
Pico I	0.183
Pico II	0.167
Pico III	0.226
Pico IV	0.245
Pico V	0.344

TABLA 10

RESULTADOS RESUMIDOS DE LAS DETERMINACIONES DE PROTEINA Y DE ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE USANDO SANGRE DE CONEJO Y SANGRE HUMANA.

<u>MUESTRA</u>	<u>CONTENIDO DE PROTEINA</u>		<u>CAP. HEMAGLUTINANTE</u>		
	<u>MG/ML</u>	<u>MG/G. DE LIOF.</u>	<u>CONEJO</u>	<u>HUMANA</u>	
			<u>Pozo (DILUCIÓN)</u>	<u>A</u>	<u>B O</u>
<u>PHASEOLUS. COCCINEUS</u>					
EXTRACTO CRUDO (1g. DE MUESTRA EN 10ML DE SSI)	2.0	-	7+	3+	3+ 3+
* LIOFILIZADO TOTAL	-	0.94	7+	4+	2+ 3+
* PICO I (LIOFILIZADO)	-	0.98	8+	4+	2+ 3+
* PICO II (LIOFILIZADO)	-	0.92	7+	4+	1+ 3+

CAP. HEMAGLUTINANTE

<u>MUESTRA</u>	<u>CONTENIDO DE PROTEINA</u>		<u>CONEJO</u>	<u>HUMANA</u>		
	<u>MG/ML</u>	<u>MG/G. DE LIOF.</u>		<u>POZO (DILUCIÓN)</u>		
				<u>A</u>	<u>B</u>	<u>O</u>

PHASEOLUS LUNATUS

EXTRACTO CRUDO (1g. DE MUESTRA EN 10ML DE SSI)	3.8	-	-	1:64	-	-
* LIOFILIZADO TOTAL	-	0.97	-	-	-	-
**PICO II(LIOFILIZADO)	-	-	-	-	-	-
**PICO III(LIOFILIZADO)	-	-	-	-	-	-

<u>MUESTRA</u>	<u>CONTENIDO DE PROTEINA</u>		<u>CAP. HEMAGLUTINANTE</u>			
	<u>MG/ML</u>	<u>MG/G. DE LIOF.</u>	<u>CONEJO</u>	<u>HUMANA</u>		
				<u>A</u>	<u>B</u>	<u>O</u>
			<u>Pozo(DILUCIÓN)</u>			
<u>PHASEOLUS. VULGARIS</u>						
EXTRACTO CRUDO (1g. DE MUESTRA EN 10ML DE SSI)	3.0	-	9+	5+	6+	6+
*LIOFILIZADO TOTAL	-	0.96	10+	4+	4+	4+
*PICO I(LIOFILIZADO)	-	0.92	9+	5+	4+	4+
*PICO II(LIOFILIZADO)	-	0.92	6+	4+	3+	3+

MUESTRAS CONTROL:

FRIJOL OJO DE LIEBRE 0.97

LECTINA COMERCIAL ML 0.400

* DE LOS LIOFILIZADOS SE HIZO UNA DILUCIÓN DE 10MG/ML DE SSI PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.

** ESTAS DOS MUESTRAS NO FUE POSIBLE DETERMINAR SUS PROTEÍNAS POR HABERSE PERDIDO DURANTE EL TERREMOTO.

TABLA 11

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA

(EXPRESADA: NO. DE POZO/MG. DE PROTEÍNA)

<u>MUESTRA</u>	<u>CONEJO</u>	<u>HUMANA</u>		
		A	B	O
<u>PHASEOLUS, COCCINEUS.</u>				
EXTRACTO CRUDO	70	30	30	30
LIOFILIZADO TOTAL	148.93	95.23	47.61	63.82
PICO I(LIOFILIZADO)	163.26	81.63	40.81	61.22
PICO II(LIOFILIZADO)	152.17	86.95	21.73	65.21

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>CONEJO</u>	<u>HUMANA</u>		
		A	B	O
<u>PHASEOLUS, LUNATUS</u>				
EXTRACTO CRUDO	-	26.31	-	-
LIOFILIZADO TOTAL	-	82.47	-	-
PICO I(LIOFILIZADO)	-	-	-	-
PICO II(LIOFILIZADO)	-	-	-	-
<u>PHASEOLUS, VULGARIS</u>				
EXTRACTO CRUDO	60	33.3	40	40
LIOFILIZADO TOTAL	208.33	83.33	83.33	83.33
PICO I(LIOFILIZADO)	346.15	192.30	153.84	153.84
PICO II(LIOFILIZADO)	193.54	129	96.77	96.77

DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA EN LAS TRES MUESTRAS PUEDE DARSE CUENTA, QUE PARA LOS ERITROCITOS DE CONEJO TODAS LAS MUESTRAS TRABAJADAS YA SEA EXTRACTO CRUDO, LIOFILIZADO TOTAL O LAS FRACCIONES LIOFILIZADAS PRESENTAN EN GENERAL UNA ALTA ACTIVIDAD ESPECÍFICA, SIENDO MAYOR LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LA FRACCIÓN I DE PHASEOLUS, VULGARIS.

A CONTINUACIÓN SE MUESTRA UNA TABLA CON LOS VALORES DE ACTIVIDADES ESPECÍFICAS DE MAYOR A MENOR VALOR INDICANDO A QUE FRACCIÓN DE CADA ESPECIE PERTENECE.

TABLA 12

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL. / MG. DE PROT.) (SANGRE DE CONEJO)
<u>P. VULGARIS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	346.15
<u>P. VULGARIS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	208.33
<u>P. VULGARIS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	193.54
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	163.26

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL. / MG. DE PROT.) (SANGRE DE CONEJO)
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	152.17
<u>P. COCCINEUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	148.93
<u>P. COCCINEUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	70.0
<u>P. VULGARIS</u> (EXTRACTO CRUDO)	60.0
<u>P. LUNATUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	-
<u>P. LUNATUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	-
<u>P. LUNATUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	-

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL./MG. DE) (SANGRE DE CONEJO) PROT.
----------------	--

<u>P. LUNATUS</u> (PICO III LIOFILIZADO)	
---	--

EN EL CASO DE ERITROCITOS HUMANOS SE TRABAJÓ CON LOS TRES TIPOS DE SANGRE; A, B Y O Y SE MUESTRAN A CONTINUACIÓN:

TABLA 13

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL./MG. DE) (SANGRE DEL GRUPO A) PROT.
----------------	--

<u>P. VULGARIS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	192.30
--	--------

<u>P. VULGARIS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	129.0
---	-------

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL./MG. DE (SANGRE DEL GRUPO A) PROT.)
<u>P. COCCINEUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	95.23
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	86.95
<u>P. VULGARIS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	83.33
<u>P. LUNATUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	82.47
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	81.63
<u>P. VULGARIS</u> (EXTRACTO CRUDO)	33.3
<u>P. COCCINEUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	30.0

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA (DIL./MG. DE)</u> <u>(SANGRE DEL GRUPO A)</u> <u>PROT.</u>
<u>P.LUNATUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	26.31
<u>P.LUNATUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	-
<u>P.LUNATUS</u> (PICO III LIOFILIZADO)	-
<u>P.COCCINEUS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	-
<u>P.COCCINEUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	-

TABLA 14

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL./MG. DE PROT.) (SANGRE DEL GRUPO B)
<u>P. VULGARIS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	153.84
<u>P. VULGARIS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	96.77
<u>P. VULGARIS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	83.33
<u>P. COCCINEUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	47.61
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	40.81
<u>P. VULGARIS</u> (EXTRACTO CRUDO)	40.0
<u>P. COCCINEUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	30.0

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL./MG. DE PROT.) (SANGRE DEL GRUPO B)
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	-
<u>P. LUNATUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	-
<u>P. LUNATUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	-
<u>P. LUNATUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	-
<u>P. LUNATUS</u> (PICO III LIOFILIZADO)	-

TABLA 15

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA (DIL. /MG. DE)</u> (SANGRE DEL GRUPO 0) PROT.
<u>P. VULGARIS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	153.84
<u>P. VULGARIS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	96.77
<u>P. VULGARIS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	83.33
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	65.21
<u>P. COCCINEUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	63.82
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	61.22
<u>P. VULGARIS</u> (EXTRACTO CRUDO)	40.0
<u>P. COCCINEUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	30.0

(CONTINUA)

<u>MUESTRA</u>	<u>ACTIVIDAD ESPECIFICA</u> (DIL. / MG. DE PROT.) (SANGRE DEL GRUPO 0)
----------------	---

<u>P. LUNATUS</u> (EXTRACTO CRUDO)	-
--	---

<u>P. LUNATUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	-
--	---

<u>P. LUNATUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	-
--	---

<u>P. LUNATUS</u> (PICO III LIOFILIZADO)	-
---	---

DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE PUEDE VER QUE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA AUMENTA DE ACUERDO AL GRADO DE PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Y ASÍ SE TIENE QUE EN LOS EXTRACTOS CRUDOS SON MUCHO MÁS BAJOS LOS VALORES, SI SE COMPARA CON LOS OBTENIDOS TANTO EN EL LIOFILIZADO TOTAL COMO EN LAS FRACCIONES LIOFILIZADAS (PICOS), LO QUE INDICA QUE ENTRE MÁS PURIFICADA SE ENCUENTRE LA PROTEÍNA MAYOR SERÁ SU ACTIVIDAD ESPECÍFICA.

ACTIVIDAD MITOGÉNICA.-

LA SIGUIENTE PRUEBA QUE SE REALIZÓ CONSISTIÓ EN MEDIR LA ACTIVIDAD MITOGÉNICA EN LOS FRIJOLES ESTUDIADOS. EN LA CUAL SE VE LA ACCIÓN ESTIMULADORA DE LAS DIFERENTES LECTINAS SOBRE CULTIVOS DE LINFOCITOS TANTO A LAS 48 HORAS COMO A LAS 72 HORAS, COMO CONTROLES SE USARON: LA LECTINA OBTENIDA DEL FRIJOL "OJO DE LIEBRE" Y UNA COMERCIAL LLAMADA "ML", CON LAS CUALES SE TRABAJA EN EL DEPARTAMENTO DE GÉNETICA DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL (IMSS), OBTENIÉNDOSE BUENOS RESULTADOS.

EL CULTIVO DE LINFOCITOS DE 48 HORAS MUESTRA LOS SIGUIENTES RESULTADOS:

EN GENERAL EL NÚMERO DE CÉLULAS NO TRANSFORMADAS ES MAYOR QUE EL DE CÉLULAS TRANSFORMADAS HABIENDO UN MÍNIMO DE MITOSIS PRESENTES, CON EXCEPCIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS CONTROLES QUE MUESTRAN QUE LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS SE ENCUENTRAN EN MAYOR CANTIDAD QUE LAS NO TRANSFORMADAS, LO QUE HACE NOTAR QUE LAS LECTINAS DEL FRIJOL "OJO DE LIEBRE" Y LA COMERCIAL "ML" POSEEN UN ALTO GRADO DE ESTIMULACIÓN SOBRE LOS LINFOCITOS EN COMPARACIÓN CON LAS LECTINAS OBTENIDAS A PARTIR DE PHASEOLUS.COCCINEUS, PHASEOLUS.LUNATUS Y PHASEOLUS.VULGARIS AISLADAS EN ESTE TRABAJO.

SIN EMBARGO, EN LOS CULTIVOS DE 72 HORAS SE NOTA COMO DISMINUYE LA CANTIDAD DE CÉLULAS NO TRANSFORMADAS EN EL MEDIO DE CULTIVO Y COMO AUMENTA LA CANTIDAD DE CÉLULAS TRANSFORMADAS Y DE MITOSIS PRESENTES QUE COMPARANDO CON LAS MUESTRAS CONTROL VEMOS QUE EL ESTÍMULO MITÓTICO ES MAYOR EN LAS LECTINAS DE LOS FRIJOLES PHASEOLUS.COCCINEUS, PHASEOLUS.LUNATUS Y PHASEOLUS.VULGARIS, QUE EL ESTÍMULO PROVOCADO POR LAS LECTINAS PERTENECIENTES A LAS MUESTRAS CONTROL DEL FRIJOL "OJO DE LIEBRE" Y LA COMERCIAL "ML".

EN SEGUIDA SE PRESENTA LOS FRIJOLES QUE EN ORDEN DECRECIENTE MUESTRAN ESTIMULACIÓN MITOGÉNICA.

TABLA 16

<u>MUESTRA</u>	% DE AUMENTO DE MITOSIS DE UN CULTIVO DE 48 HR. A 72 HR.
<u>P. VULGARIS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	2.27%
<u>P. VULGARIS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	2.2%
"OJO DE LIEBRE" (MUESTRA CONTROL)	1.65%
<u>P. COCCINEUS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	1.5%
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO II LIOFILIZADO)	1.13%
<u>P. VULGARIS</u> (LIOFILIZADO TOTAL)	1.0%
LECTINA COMERCIAL "ML" (MUESTRA CONTROL)	0.6%
<u>P. COCCINEUS</u> (PICO I LIOFILIZADO)	0.3%

MUESTRA

% DE AUMENTO DE MITOSIS DE
UN CULTIVO DE 48 HR. A 72 HR.

P. LUNATUS

(LIOFILIZADO TOTAL)

0%

P. LUNATUS

(PICO II LIOFILIZADO)

0%

P. LUNATUS

(PICO III LIOFILIZADO)

0%

EN LA TABLA 17 SE PRESENTA EN FORMA RESUMIDA LOS RESULTA
DOS DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA MITOGÉNICA EN LAS TRES ESPECIES
DE PHASEOLUS ESTUDIADAS.

TABLA 17

CUADRO DE RESULTADOS RESUMIDOS QUE MUESTRAN EL
PORCENTAJE DE ACTIVIDAD MITOGENICA EN LAS TRES
ESPECIES DE PHASEOLUS ESTUDIADAS.

N.T = CÉLULAS NO TRANSFORMADAS.

T = CÉLULAS TRANSFORMADAS.

M = MITOSIS PRESENTES EN EL MEDIO DE CULTIVO.

CULTIVO DE 48 HR.CULTIVO DE 72 HR.P. COCCINEUS
(LIOFILIZADO TOTAL)

N.T	=	72.1%	27.46%
T	=	27.9%	71.03%
M	=	-	1.5%

P. COCCINEUS
(PICO I LIOFILIZADO)

N.T	=	59.56%	56.26%
T	=	40.33%	43.33%
M	=	0.1%	0.4%

P. COCCINEUS
(PICO II LIOFILIZADO)

N.T	=	69.36%	47.16%
T	=	30.63%	51.7%
M	=	-	1.13%

(CONTINUA)

CULTIVO DE 48 HR.CULTIVO DE 72 HR.P. LUNATUS
(LIOFILIZADO TOTAL)

N.T	=	98.53%	100%
T	=	1.46%	-
M	=	-	-

P. LUNATUS
(PICO III LIOFILIZADO)

N.T	=	89.53%	100%
T	=	10.46%	-
M	=	-	-

P. VULGARIS
(LIOFILIZADO TOTAL)

N.T	=	70%	25.16%
T	=	29.8%	73.63%
M	=	0.2%	1.2%

(CONTINUA)

CULTIVO DE 48 HR.CULTIVO DE 72 HR.P. VULGARIS

(PICO I LIOFILIZADO)

N.T	=	63.83%	18.06%
T	=	53.53%	79.1%
M	=	0.63%	2.83%

P. VULGARIS

(PICO II LIOFILIZADO)

N.T	=	41.86%	21.63%
T	=	57.7%	75.66%
M	=	0.43%	2.7%

OJO DE LIEBRE

(MUESTRA CONTROL)

N.T	=	34.86%	23.56%
T	=	64.26%	73.93%
M	=	0.86%	2.5%

(CONTINUA)

CULTIVO DE 48 HR.CULTIVO DE 72 HR.LECTINA COMERCIAL "ML"
(MUESTRA CONTROL)

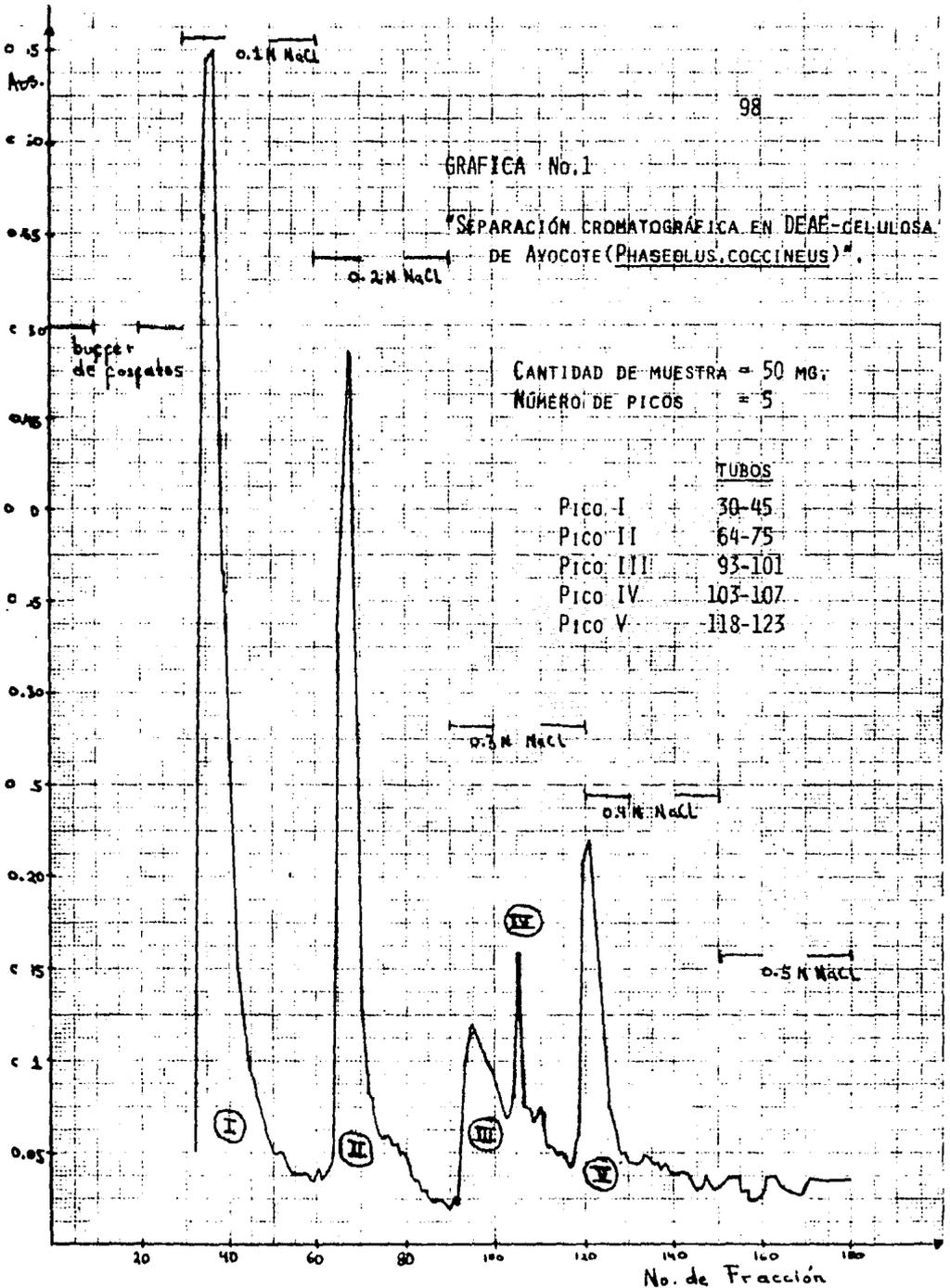
N.T	=	35.3%	31.83%
T	=	64.06%	66.93%
M	=	0.63%	1.23%

ESTOS RESULTADOS INDICAN QUE EL FRIJOL PHASEOLUS.VULGARIS, VARIEDAD CANARIO 107, PRINCIPALMENTE LAS FRACCIONES I Y II SON BUENOS AGENTES ESTIMULADORES DE LINFOCITOS, PROVOCANDO UN BUEN PORCENTAJE DE MITOSIS PRODUCIDO EN UN TIEMPO DE 72 HR. YA QUE SUPERAN EL PORCENTAJE DE MITOSIS PRODUCIDO POR LAS MUESTRAS USADAS COMO CONTROL, QUE SON "OJO DE LIEBRE" CON 1.65% Y LA LECTINA COMERCIAL "ML" CON 0.6%, SIENDO LA MENOS POTENTE, LA LECTINA DE LA FRACCIÓN I DEL FRIJOL PHASEOLUS.COCCINEUS, VARIEDAD AYOCOTE YA QUE SOLO OBTUVIMOS 0.3% DE MITOSIS EN EL MEDIO DE CULTIVO.

LA LECTINA PRESENTE EN EL PHASEOLUS.LUNATUS, VARIEDAD CIAT-328-I CARECE DE POTENCIA TOTAL LO QUE INDICA QUE ESTA ESPECIE NO SE PUEDE UTILIZAR COMO AGENTE MITOGÉNICO.

GRAFICA No.1

"SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA EN DEAE-GELULOSA
DE AYOCOTE (PHASEOLUS COCCINEUS)"



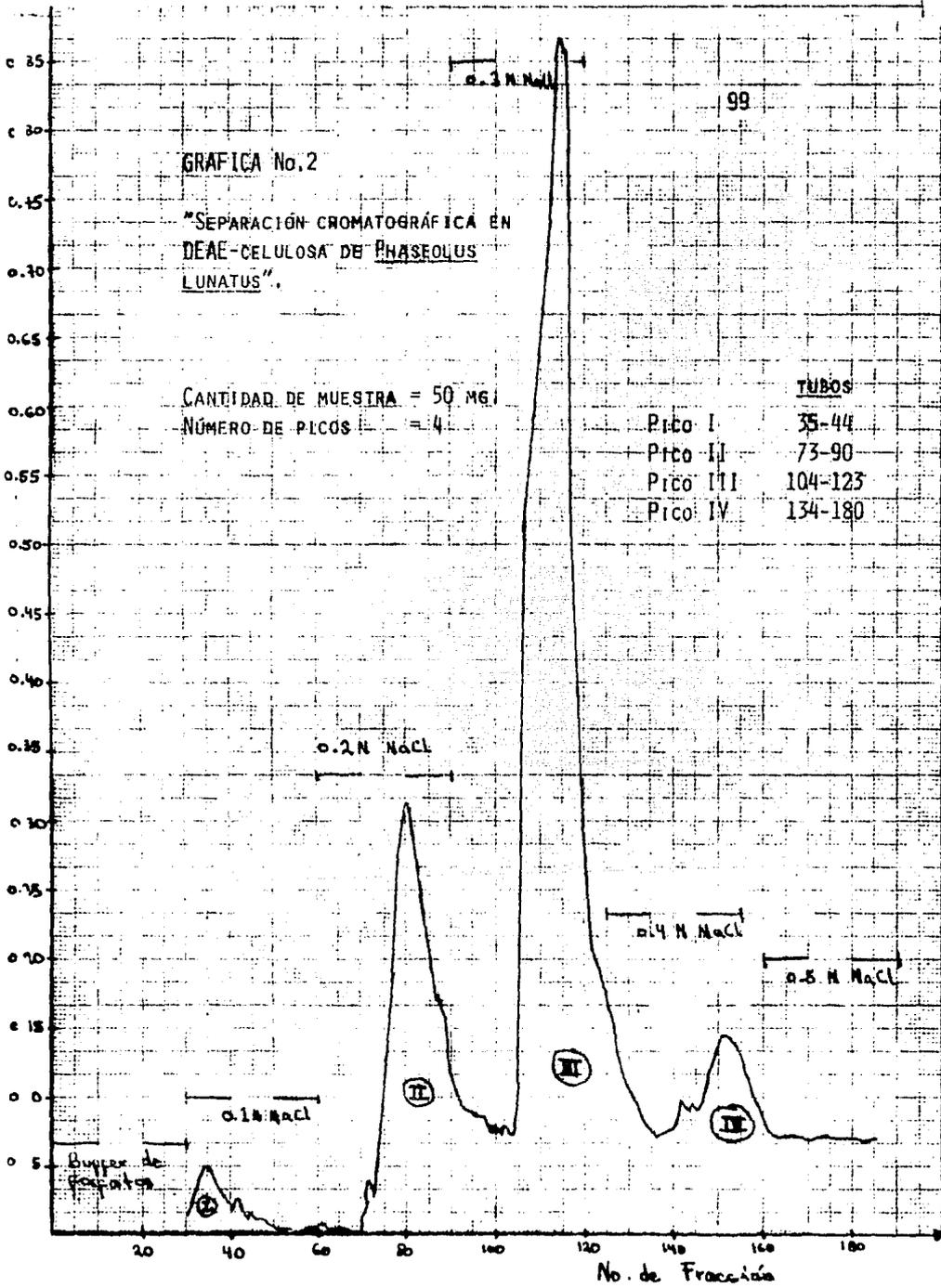
GRAFICA No.2

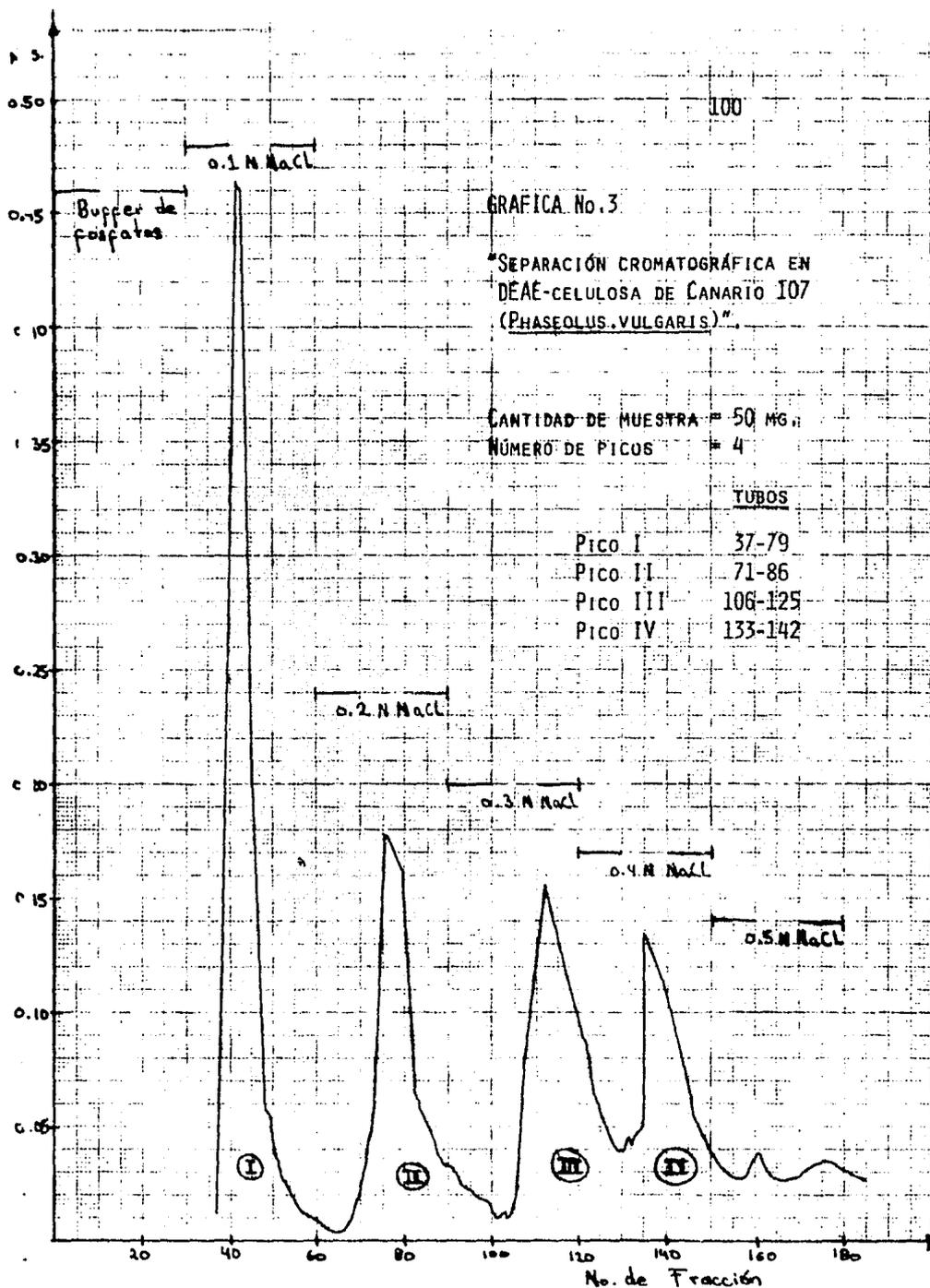
"SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA EN DEAE-CELULOSA DE PHASEOLUS LUNATUS".

CANTIDAD DE MUESTRA = 50 mg.
 NÚMERO DE PICOS = 4

TUBOS

Pico I	35-44
Pico II	73-90
Pico III	104-123
Pico IV	134-180



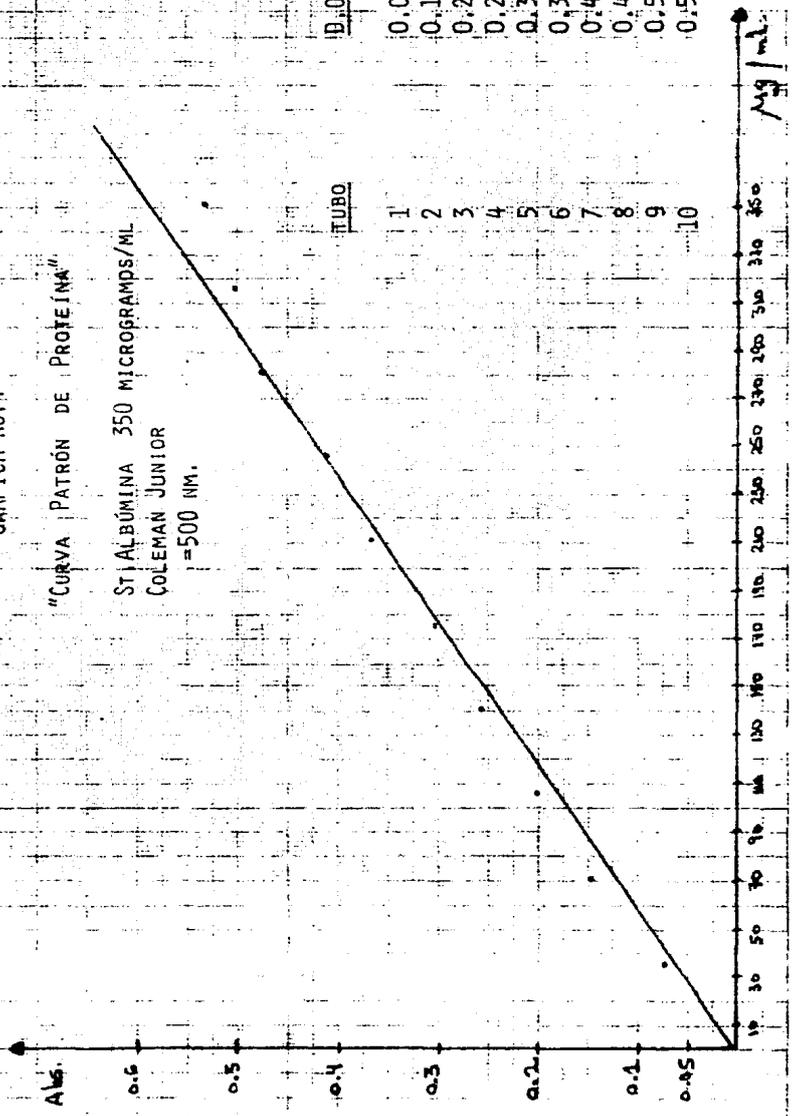


101

GRAFICA No. 4

"CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA"

ST ALBÚMINA 350 MICROGRAMPS/ML
COLEMAN JUNIOR
=500 NM.



Abs

TUBO

μg/ml

CAPITULO IV

CONCLUSIONES:

DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS, SE PUEDE DECIR QUE SE CUMPLIERON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS EN UN PRINCIPIO:

- SE LOGRÓ REALIZAR UNA BUENA EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS LECTINAS PRESENTES EN LAS TRES ESPECIES DE PHASEOLUS ANALIZADAS.

- LA METODOLOGÍA CON LA CUAL SE LLEVÓ A CABO LA EXTRACCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LAS LECTINAS DIO BUENOS RESULTADOS, ES FÁCIL DE REALIZAR Y NO ES COSTOSA POR LO QUE ES RECOMENDABLE PARA ESTE ESTUDIO.

- DEL PHASEOLUS, COCCINEUS, SE OBTUVIERON DOS FRACCIONES: I Y II TENIENDO LAS DOS FRACCIONES BUENA CAPACIDAD HEMAGLUTINANTE Y MOSTRANDO LA FRACCIÓN II UNA ALTA CAPACIDAD COMO AGENTE MITOGÉNICO.

- EL PHASEOLUS LUNATUS, PRESENTÓ DOS FRACCIONES CON ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE II Y III. SU CAPACIDAD HEMAGLUTINANTE ES ESPECÍFICA PARA LA SANGRE HUMANA DEL GRUPO A, SIENDO NULO SU USO COMO AGENTES MITOGÉNICOS.

- EL PHASEOLUS VULGARIS PRESENTÓ DOS FRACCIONES: I Y II SIENDO ÉSTAS BUENOS AGENTES HEMAGLUTINÓGENOS Y TENIENDO UNA ALTA CAPACIDAD MITOGÉNICA, POR LO TANTO SON CONSIDERADOS COMO MUY BUENOS AGENTES MITOGÉNICOS.

- SE DEMOSTRÓ QUE LAS LECTINAS AISLADAS EN ESTE TRABAJO SON BUENOS AGENTES ESTIMULADORES DE LINFOCITOS, LO CUAL TIENE APLICACIÓN EN CLÍNICA, PARA DETECTAR VARIAS ANOMALÍAS DE ORIGEN INMUNOLÓGICO.

- FINALMENTE SE PUEDE CONCLUIR QUE LAS LECTINAS OBTENIDAS A PARTIR DE P. COCCINEUS, P. LUNATUS Y DE P. VULGARIS POSEEN MEJOR CAPACIDAD COMO AGENTES ESTIMULADORES DE LINFOCITOS QUE LA OBSERVADA EN LA LECTINA COMERCIAL "ML", POR LO QUE CONVIENE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS LECTINAS CONTENIDAS EN LAS DOS DE LAS TRES ESPECIES DE PHASEOLUS ESTUDIADAS, QUE SON P. COCCINEUS Y P. VULGARIS, Y RESULTA BENEFICO PARA EL PAÍS YA QUE SU OBTENCIÓN NO ES COSTOSA, ES RELATIVAMENTE SENCILLA Y DICHAS LECTINAS SON DE SUMA UTILIDAD Y APLICACIÓN EN EL ÁREA DE LA CLÍNICA EN DONDE EN LA ACTUALIDAD SE EMPLEAN LECTINAS DE FABRICACIÓN EXTRANJERA DE ALTO COSTO.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA:

- 1.-ANDREWS, T.A. "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TWO COMPONENTS FROM A TOXIC AGGLUTINATING EXTRACT", J. BIOCHEM., 139/421-429 (1974).
- 2.-BARRET, M.E. J., STRACHAN, J.P AND PORTER, P. "IMMUNOLOGICALLY MEDIATED NUTRITIONAL DISTURBANCES ASSOCIATED WITH SOYA PROTEIN ANTIGENS". PROC. NUTR. SOC. 38/143-150 (1979).
- 3.-BAUMANN, M. CH., STROSBERG, D.A AND RUDIGER, H. "PURIFICATION AND CHARACTERITATION OF MANNOSE/GLUCOSE-SPECIFIC LECTIN FROM VICIA CRACCA". EUR. J. BIOCHEM. 122/105-110 (1982).
- 4.-BROWN, J.M.S., OSBORNE, T.C., BLISS, F.A., HALL, T.C. "BEAN LECTINS". THEO. APPL. GENET. 62/263-271 (1982).
- 5.-BORREBAECK, A.K.C. "DETECTION AND CHARACTERITATION OF A LECTIN FROM NON-SEED TISSUE OF PHASEOLUS VULGARIS". PLANTA. 161/223-228 (1984).
- 6.-BRÜCHER, O., PALOZZO, A., JAFFÉ, W.G. "DETECTION OF FOUR DIFFERENT TYPES OF HEMAGGLITINS IN BEANS PHASEOLUS VULGARIS". Z. IMMUNITÄTS FORSCH. 142/439 (1972).
- 7.-CARON, M., DEUGNIER, M.A., JOUBERT, R. "BIOLOGICAL FUNCTIONS OF LECTINS". MARKER PROTEINS IN INFLAMMATION. 2/641-650 (1984).
- 8.-DAHLGREN, K., PORATH, J., KIESSLING, K.L. "THE PURIFICATION OF PHYTOHAEMAGGLUTININS OF SEED PHASEOLUS VULGARIS". ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS. 137/306-314 (1970).

- 9.-DE MUELENAERE, H. J. H. "TOXICITY AND HEMAGGLUTINATING ACTIVITY OF LEGUMES." NATURE, 206/827-828 (1965).
- 10.-DILLNER-CENTERLING, M. L., AXELSSON, B., HAMMARSTRÖN, S., HELLSTRÖN, U., PERLMANN, P. "INTERACTION OF LECTIN WITH HUMAN T LYMPHOCYTES MITOGENIC PROPERTIES, INHIBITORY EFFECTS, BINDING TO THE CELL MEMBRANE AND TO ISOLATED SURFACE GLYCOPEPTIDES". EUR. J. IMMUNOL., 10/434-442 (1980).
- 11.-DUPUIS, G., LECLAIR, B. "STUDIES ON PHASEOLUS VULGARIS PHYTOHEMAGGLUTININS STRUCTURAL REQUIREMENTS FOR SIMPLE SUGARS TO INHIBIT THE AGGLUTINATION OF HUMAN GROUP A ERITHROCYTES". BIOMEDICAL PRESS, 144/1/29-32 (1982).
- 12.-FUDENBERG, HUGH, H., STITES, P. D.
 IMMUNOLOGIA CLINICA.
 3A. EDICIÓN.
 EL MANUAL MODERNO, S. A DE C. V.
 MÉXICO, D. F (1982).
- 13.-GARRIDO, J. "ULTRASTRUCTURAL LABELING OF CELLS SURFACE LECTIN RECEPTORS DURING THE CELL CYCLE". EXPTL CELL RES. 94/159-175 (1975).
- 14.-GIBBS, J. H., POTTS, R. C., BROWN, R., ROBERTSON, A. J., BECK, J. S. "MECHANISMS OF PHYTOHEMAGGLUTININ (PHA) STIMULATION OF NORMAL HUMAN LYMPHOCYTES: 'TRIGGER', 'PUSH' OR BOTH?". CELL TISSUE KINET. 15/131-137 (1982).
- 15.-GILBREATH, M. J., GROVES, J., PAVANAD, K., PHISPHUMUITHI, P. "SUPPRESSION OF MITOGENIC LECTIN-INDUCED BLAST TRANSFORMATION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS BY PYRIMETHORINE". TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HIGIENE, 77/6/743-747 (1983).

- 16.-GILBREATH,M.J.,KONGEHAREON,S.,WIMONWATTRAWATTE,T.,
PHISPHUMVITHI,P.,PAVANAND,K. "INHIBITION OF MITOGENIC
LECTIN INDUCED BLAST TRANSFORMATION IN HUMAN PERIPHERAL
BLOOD MONONUCLEAR CELLS BY MEFLOQUINE",TRANSACTIONS
OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDECINE AND HIGIENE,
77/6/767-770 (1983).
- 17.-GONZÁLEZ-GARZA,M.T.,SUOSA,V.,SOTELO,A. "DIFERENTE
CITOTOXICIDAD DE LAS FRACCIONES DE PROTEÍNA AISLADA
DEL FRIJOL ESCUMITE(PHASEOLUS.ACUTIFOLIUS),QUAL PLANT
FOODS HUM NUTR,31/319-325 (1982),
- 18.-HARTREÉ,E.F. "DETERMINATION OF PROTEIN:A MODIFICATION
OF THE LOWRY METHOD THAT GIVES A LINEAR PHOTOMETRIC
RESPONSE",ANAL.BIOCHEM,48/422-427 (1972),
- 19.-HONAVAR,P.M.,SHIH,C.V.,LIENER,I.E. "THE INHIBITION
OF THE GROWTH OF RATS BY PURIFIED HEMAGGLUTININ FRACTIONS
ISOLATED FROM PHASEOLUS.VULGARIS,"NUTR,77/109-115 (1962),
- 20.-IAN,J.,STRIJDOM,W.B. "PROPERTIES OF LECTINS IN THE
ROOT AND SEED OF LOTONONIS,BAINESII",PLANT PHYSIOL,
74/773-778 (1984),
- 21.-INBAR,M.,HUET,C.,OSEROFF,A.R.,BENBASSAT,H.,SACHS,L.
"INHIBITION OF LECTIN AGGLUTINABILITY BY FIXATION OF
THE CELL SURFACE MEMBRANE",BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA,
311/594-599 (1973),
- 22.-ITO,H.,KONDO,K.,KOMADA,H.,IZUTSU,K.,SHIMABAYASHI,Y.,
TAKAHASHI,T. "PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA
LECTINA DE SEMILLA DE PHASEOLUS,VULGARIS",AGRIC.BIOL.CHEM,
44/1/125-133 (1980),

- 23.-JAFFÉ,W.G.,VEGA-LATTE,C. "HEAT LABILE GROWTH INHIBITING FACTORS IN BEANS PHASEOLUS,VULGARIS".J.NUTR,94/202-211 (1968).
- 24.-JAFFÉ,W.G.,BRUCHER,O. "TOXICIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIFERENTES FITOHEMAGLUTININAS DE FRIJOLES PHASEOLUS VULGARIS". ARCH,LATINOAM,NUTR,22/267-281 (1972).
- 25.-JAFFÉ,W.G.,CANEJO,G. "LA ACCIÓN DE UNA PROTEÍNA TÓXICA,AISLADA DE CARATOAS NEGRAS(PHASEOLUS,VULGARIS), SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL EN RATAS".ARCIVIES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS,109/59-61 (1965).
- 26.-JAFFÉ,W.G.,HANNING,K. "FRACTIONATION OF PROTEINS FROM KIDNEY BEANS(PHASEOLUS,VULGARIS)".ARCH. OF BIOCHEM. AND BIOPHYSICS,109/80-91 (1965).
- 27.-JAFFÉ,W.G.,LEVY,A.,GONZÁLEZ,D.I. "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERITATION OF BEAN PHYTOHEMAGGLUTININS". PHYTOCHEMISTRY,13/2685-2693 (1974).
- 28.-JANSON,V.K.,SAKAMOTO,C.K.,BURGER,M.M. "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AGGLUTININ RECEPTOR-SITIES". BIOCHIMICA ET BROPHYSICA ACTA,291/136-143 (1973).
- 29.-KABAT,E.A. "DIMENSIONS AND SPECIFICITIES OF RECOGNITION SITES ON LECTINS AND ANTIBODIES".J,SUPRAMOLECULAR STRUCTURE, 8/79-88 (1978).
- 30.-KORNFELD,R.,KORNFELD,S. "STRUCTURE OF MEMBRANE RECEPTORS FOR PLANT-LECTINS".ANNUAL NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES,276-282 (1974).

31.-LEHNINGER,L.A.

BIOQUIMICA

2A.EDICIÓN

EDICIONES OMEGA,S.A.

BARCELONA,(1975).

32.-LIENER,I.E. "TOXINS IN LEGUMES:THEIR POSSIBLE
NUTRITIONAL SIGNIFICANCE IN THE DIET OF MAN".

FOOD AND NUTRITION PRESS,348-369 (1978).

33.-LUNDBORG,T. "FRACTIONATION OF LEAF PROTEINS BY
DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION AND GEL FILTRATION".

PHYSIOL PLANT,48/175-185 (1980).

34.-MATSUMOTO,I.,OSAVA,T. "THE SPECIFIC PURIFICATION
OF VARIOUS CARBOHYDRATE-BINDING HEMAGGLUTININS".

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATION,
46/5/1818-1815 (1972).

35.-MONSIGNY.M.,ROCHE,A.C.,SENE,C.,MAGET-DONA.R.,DELMONTE,
F. "SUGAR-LECTIN INTERACTIONS:HOW DOES WHEAT GERM

AGGLUTININ BIND SIALO GLYCOCONJUGATES?"EUR.J.BIOCHEM,
104/147-153 (1980).

36.-MOORHEAD,P.S.,NOWELL,P.C.,MELLMAN,D.M.,HUNGERFORD,D.A.

"CHROMOSOME PREPARATIONS OF LEUKOCYTES CULTURED FROM
HUMAN PERIPHERAL BLOOD",EXP CELL RES,20/613-616 (1960).

37.-MORREL,R.M. "LECTIN-MEDIATED MODULATION OF LYMPHOCYTE
FUNCTIONS",RECOGNITION PROTEINS,RECEPTORS AND PROBES:

INVERTEBRATES,149-175 (1984).

- 38.-MUKHERJEE, A.B. "RELATIONSHIP BETWEEN NUCLEIC ACIDS, HISTONE AND NON HISTONE PROTEIN SYNTHESIS IN HUMAN LYMPHOCYTE STIMULATED WITH PHYTOHEMAGGLUTININ". J. GENET. CYTOL. 12/151-159 (1970).
- 39.-NEUBERGER, A. "WHAT LECTINS AND CARBOHYDRATES ARE MADE FOR?". BIOL. CELL. 51/113-114 (1984).
- 40.-NO'VAKOVA', N., KOCOEREK, J. "STUDIES OF PHYTOHEMAGGLUTININS, SCARLET RUANER SEEDS (PHASEOLUS, COCCINEUS)". BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 359/320-333 (1974).
- 41.-OHTANI, K., SHIBATA, S., MISAKI, A. "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION AL TORA-BEAN (PHAESOLUS, VULGARIS) LECTIN". J. BIOCHEM. 87/2/407-416 (1980).
- 42.-OLSNES, S. "ABRIN AND RICIN: STRUCTURE AND MECHANISMS OF ACTION OF TWO TOXIC LECTINS". BULLETIIN DE L'INSTITUT PASTEUR. 74/85-99 (1976).
- 43.-O'NEILL, M.A., SELVANDREN, R.R. "GLYCOPROTEINS FROM THE CELL WALL OF PHASEOLUS, COCCINEUS". J. BIOCHEM. 187/53-63 (1980).
- 44.-PANDOLFINO, R.E., MAGNUSON, A.J. " Mn^{2+} AND Ca^{2+} BINDING TO THE LIMA BEAN LECTINS". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 255/3/870-873 (1980).
- 45.-PERRY, A., OFEH, I. "INHIBITION OF BLOOD CLEARENCE AND HEPATIC TISSUE BINDING OF E. COLI BY LIVER LECTIN-SPECIFIC SUGAR ANG GLYCOPROTEINS". INFECTION AND IMMUNITY. 43/1/257-262 (1984).
- 46.-PUSZTAI, A., CLARKE, M.W.E., KING, P.T. "THE NUTRITIONAL TOXICITY OF PHASEOLUS, VULGARIS LECTINS". PROC. NUTR. SOC. 38/115-120 (1979).

47.-ROBERTS,D.D.,GOLDSTEIN,J.I. "HIDROPHOBIC BINDING PROPERTIES OF THE LECTIN FROM LIMA BEANS PHASEOLUS,LUNATUS", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,257/19/11274-11277 (1982).

48.-SANDVING,K.,GLSNESS,S.,PIHL,A. "KINETICS OF BINDING OF THE TOXIC LECTINS ABRIN AND RICIN TO SURFACE RECEPTORS OF HUMAN CELLS",THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 251/3/3977-3984 (1976).

49.-SOTELO,L.A.,HERNÁNDEZ,M.,ARTEAGA,C.M.E. "INHIBIDORES DE TRIPSINA Y HEMAGLUTININAS EN ALGUNAS LEGUMINOSAS COMESTIBLES",ARCH.INVEST.MÉD,9/1/1-13 (1978).

50.-STEAD,R.H.,DE MUELENAERE,H.J.H.,QUICKE,V.G. "TRYPSIN INHIBITION HEMAGGLUTINATION AND INTRAPERITONEAL TOXICITY OF EXTRACTS OF PHASEOLUS,VULGARIS AND GLYCINE MAX.",ARCH.BIOCHEM.BIOPHYS,113/703-712 (1966).

51.-TAKAHASHI,T.,SHIMABAYASHI,Y.,IWAMOTO,K.,IZUTSU,K., LIENER,E.I. "THE ROLE OF METAL IONS IN THE HEMAGGLUTINATING ACTIVITY OF THE WAX BEAN HEMAGGLUTININ",AGR.BIOL,CHEM, 35/8/1274-1279 (1971).

52.-TAKAHASHI,T.,RAMACHANDRAMURTHY,P.,LIENER,I.E. "SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF A PHYTOHEMAGGLUTININ ISOLATED FROM PHASEOLUS,VULGARIS", BIOCHIM,BIOPHYS,ACTA,133/123-133 (1967).

53.-TOOR,B.,MC.GREGOR,L.,MC.GREGOR,J.,RENAUD,S.,CLEMETSON, J.K. "THE USE OF LECTINS TO STUDY CHANGES IN RAT PLATELET MEMBRANE GLYCOPROTEINS INDUCED BY ORAL CONTRACEPTIVES", MARKER PROTEINS IN INFLAMMATION,2/597-600 (1984).

54.-Tsam,M.F.,Scheffel,U.,Denisan,R.C. "LECTIN-DEPENDENT NEUTROPHIL CYTOTOXICITY: ENHANCED SUSCEPTIBILITY OF DESIALYLATED RES CELLS", J. CELLULAR PHYSIOL. 102/343-349 (1980).

55.-Turner,R.H.,Liener,I.E. "THE EFFECT OF THE SELECTIVE REMOVAL OF HEMAGGLUTININS OF THE NUTRITIVE VALUE OF SOYBEANS", J. AGRIC. FOOD. CHEM. 23/3/484-486 (1975).

56.-Utsumi,S.,Mori,T. "HETEROGENEITY OF BROAD BEAN LEGUMIN", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 621/179-189 (1980).

57.-Utsumi,S.,Mori,T. "PURIFICATION OF THE PHYTOHEMAGGLUTININ FAMILY OF PROTEINS FROM RED KIDNEY BEANS (PHASEOLUS, VULGARIS) BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. 905/72-81 (1975).

58.-Vlodavsky,I.,Sochs,L. "LECTIN RECEPTORS OF THE CELLS SURFACE MEMBRANE AND THE KINETICS OF LECTIN-INDUCED CELL AGGLUTINATION", EXPERIMENTAL CELL RESEARCH. 93/111-119 (1975).

59.-Wirner,G.J.,Levy,A.,González,D.I. "ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BEAN PHYTOHEMAGGLUTININS", BIOCHEMISTRY. 13/2685-2693 (1974).