

11261
25
25



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

División de Estudios de Postgrado

**PURIFICACION Y CARACTERIZACION
DE LA LECTINA DE PHASEOLUS
ACUTIFOLIUS VAR. LATIFOLIUS.**

TESIS DE POSTGRADO

Que para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA: INMUNOLOGIA

P r e s e n t a :

Armando Francisco Vargas Albores

México, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1987



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

CONTENIDOS.

1.0. INTRODUCCION.

1.1. Generalidades.....	1
1.2. Historia.....	2
1.3. Purificación.....	4
1.4. Estructura.....	5
1.5. Función.....	7
1.6. El Género Phaseolus.....	10

2.0. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Materiales y Métodos.....	15
2.3. Resultados.....	20
2.4. Conclusión.....	29

3.0. DISCUSION..... 30

4.0. BIBLIOGRAFIA 41

ABREVIATURAS

BSA	Albumina serica bovina
Da	1 Dalton = 1.661×10^{-24} g.
EDTA	Etilendiaminotetracetico
GRC	Globulos rojos de carnero
IgG	Inmunoglobulina G.
N-Ac-Gal	N-acetil-D-galactosamina
nm	nanometro (10^{-9} m)
PBS	solucion salina amortiguada con fosfatos
PBSA	PBS + azida de sodio al 0.1%.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
2-ME	2-mercaptoetanol.

LECTINA: *

APA	Abrina precatorius, aglutinina.
BSA	Bandeiraea simplicifolia, aglutinina.
CJA	Crotolaria juncea, aglutinina.
ConA	Canavalia ensiformis, Concanavalina A.
DBA	Dolichos biflorus, aglutinina.
HPA	Helix pomatia, aglutinina.
LCA	Lens culinaris, aglutinina.
LPA	Limulus polyphemus, aglutinina.
LTA	Lotus tetragonolobus, aglutinina.
MCA	Mormordia charandia, aglutinina.
PHA	Phaseolus vulgaris, fitohemaglutinina.
PLA	Phaseolus lunatus, aglutinina.
PNA	Arachis hypogaea, Peanut, aglutinina.
PSA	Pisum sativum, aglutinina.
PWM	Phytolacca americana, Pokeweed mitogen.
RCA	Ricinus communis, aglutinina.
SBA	Glycine max. Soy Bean, aglutinina.
STA	Solanum tuberosum, aglutinina.
UEA	Ulex europeus, aglutinina.
VCA	Vicia cracca, aglutinina.
WFH	Wistaria floribunda, hemaglutinina.
WFM	Wistaria floribunda, mitogenica.
WGA	Triticum vulgaris. Wheat germ, aglutinina.

* Se utilizan las siglas convencionales para las lectinas que las tienen, en caso contrario se asignan tomando en cuenta el genero y especie de donde se obtuvieron.

1.0. INTRODUCCION.

1.1. GENERALIDADES.

Los organismos vivos poseen una gran variedad de protefnas con habilidad de unirse especificamente a diferentes compuestos. Dentro de las mas importantes están: los anticuerpos, las enzimas y los receptores. Otro grupo de protefnas que poseen un sitio especifico de unión son las lectinas, cuya principal característica es la capacidad que tienen para reaccionar con azúcares en forma reversible y sin modificarlos químicamente. Algunas lectinas interactúan exclusivamente con un azúcar simple, otras tienen especificidad para un grupo de sacáridos relacionados y otras mas unicamente reaccionan con estructuras sacáridas complejas, como las que se encuentran en las glicoprotefnas y en las superficies celulares.

Debido a que el fenómeno mas estudiado es la capacidad de inducir la aglutinación de células animales en suspensión y que fueron inicialmente detectadas en vegetales, también se les conoce como: aglutininas vegetales, fitoaglutininas o fitohemaglutininas [1]. Sin embargo, como algunas de ellas tienen la habilidad de distinguir entre eritrocitos de diferentes especies, tipos sanguíneos y poblaciones linfocitarias, además de obtenerse de fuentes no vegetales, en 1954, Boyd y Sharpleigh [2] las denominaron lectinas, derivado del latín legere, que significa escoger, seleccionar.

A través de su sitio de unión, las lectinas pueden interactuar especificamente con polisacáridos y glicoprotefnas para formar

Introducción

precipitados. Esta reacción es similar a la precipitación entre el antígeno y el anticuerpo ya que es específica, es dependiente de la concentración de los reactantes y puede ser inhibida por azúcares de bajo peso molecular, actuando en forma similar a los haptenos. Sin embargo hay marcadas diferencias entre los anticuerpos y las lectinas:

- a). Los anticuerpos son sintetizados por el sistema inmune de los animales en respuesta a un estímulo antigénico, mientras que las lectinas, aparentemente, se sintetizan sin la necesidad de un estímulo.
- b). Es posible obtener anticuerpos contra casi cualquier tipo de compuesto, mientras que las lectinas parecen estar restringidas para reaccionar con carbohidratos.
- c). Mientras que los anticuerpos presentan una estructura básica común, las lectinas poseen estructuras muy diversas. Es más, dentro de una misma familia, género e incluso especie, se pueden encontrar lectinas que difieren en sus propiedades físicoquímicas y biológicas [3-5].

Independientemente de su capacidad hemaglutinante, las lectinas son de gran interés por su habilidad de interactuar con los linfocitos, de inducir diferentes productos celulares y transformación blastoide [6,7].

1.2. HISTORIA.

Al revisar la historia de las lectinas [8-10] se observa una relación muy estrecha entre su estudio y el desarrollo de la inmunología. Fue H. Stillmark, en 1888, el primero en observar el fenómeno de hemaglutinación en un extracto de Ricinus communis. Poco tiempo después, Paul Ehrlich introduce a las lectinas en la investigación inmunológica al utilizar los extractos tóxicos de Abrus precatorius y R. communis, para demostrar la especificidad

Introducción

de la respuesta inmune y la transferencia de inmunidad de madre a hijo durante el embarazo y a través de la leche.

En 1908, Landsteiner y Raubitschek trabajando con varios extractos de semillas observaron diferencias en la actividad hemaglutinante relativa cuando se probaron con eritrocitos de diferentes especies animales. Pese a ésta demostración de especie-especificidad, durante algunas décadas se sostuvo que las lectinas no eran específicas y, por lo cual, no fueron referidas con frecuencia en la literatura. Es hasta 1945 cuando la primera lectina específica es descubierta en la semilla de Phaseolus lunatus [11], aunque los resultados fueron publicados en 1949. Estudios independientes publicados por Renkonen en 1948 [12], los cuales indican que el extracto de Vicia cracca aglutina mejor a los eritrocitos tipo "A", preceden en la publicación a los trabajos de Boyd y Reguera [11].

Estas observaciones originales se fueron ampliando con el fin de identificar lectinas que pudieran utilizarse en la tipificación de grupos sanguíneos. Un extenso estudio fue presentado por Allen y Brilliantine en 1969 [13], quienes prepararon material de 2,633 plantas, de las cuales: 1,635 extractos fueron inactivos, 711 mostraron aglutinación pero no especificidad y 98 presentaron aglutinación específica. Actualmente se conocen lectinas específicas para los tipos "A", "O", "M" y "N" [18], incluso algunas que pueden distinguir los subgrupos A₁ y A₂ [14,15]. Una lectina anti-B fue aislada de la semilla de Bandeiraea simplicifolia [16,17], sin embargo no es completamente específica para el grupo B [18] por lo que no puede utilizarse como reactivo en la tipificación hematológica. Otra importante participación de las lectinas en hematología fue su utilización para demostrar que los determinantes de los grupos sanguíneos son azúcares. Esto se logró trabajando con las lectinas anti-A, obtenidas de Ph. lunatus y V. cracca, y las anti-H(O) obtenidas de Anquilla anquilla y Lotus tetragonolobus [19,20]. Los estudios sobre la especificidad de las lectinas y sus aplicaciones en la tipificación han sido extensamente revisados [1,8,9,21].

Introducción

Sin embargo las lectinas no llamaban la atención sino hasta principio de la década de los 60 cuando se descubrió la actividad mitogénica de la PHA [22] y la aglutinación preferencial de células malignas por WGA [23-25], ConA [26] y SBA [27].

1.3. PURIFICACION.

Aunque las lectinas más comunmente estudiadas han sido extraídas de plantas, particularmente de semillas de leguminosas [3,28], se han empleado diferentes fuentes, entre ellas: otras partes de las plantas [29-34], hongos [35-38], mohos [39-42], microorganismos [43-48], protozoarios [49-51], huevos de sapos [52] y peces [53-55], aves [56-62], moluscos [53,63-69], artrópodos [70-75], anguila eléctrica [76-78] y mamíferos [79-88] incluyendo plaquetas humanas [89], linfocitos [90] y macrófagos [91,92].

En muchos casos la purificación ha sido posible utilizando métodos tradicionales de química de proteínas, aunque en la actualidad la cromatografía de afinidad es muy utilizada, explotando la capacidad que tienen las lectinas de unirse específicamente a carbohidratos. Por ejemplo, ConA puede purificarse fácilmente por la capacidad que tiene de unirse a Sephadex[™], siendo posible eluirlo posteriormente con soluciones de glucosa [93] o disminuyendo el pH [94]. En forma similar, las lectinas que muestran afinidad por galactosa tales como RCA, APA, MCA y CJA, pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad en Sepharose[™] [85-97].

Para otras lectinas se requiere la unión de un receptor específico a un matriz insoluble, p.e. mucina gástrica o fetuina acoplada a Sepharose. Esto es posible por la activación de la Sepharose con bromuro de cianógeno [98,99] o por copolimerización del receptor con el anhídrido N-carboxílico de la L-leucina [100-103]. Últimamente se ha desarrollado un método de afinidad

Introducción

utilizando estroma para la purificación de aquellas lectinas cuyo ligando no ha sido precisado [104].

Varias de las dificultades encontradas en la purificación se han relacionado con el hecho de que algunas lectinas presentan diferentes estados de polimerización. Por ejemplo, ConA existe como dímero en soluciones con un pH menor de 5.6 y como un tetrámero a un pH superior [105-107]. Además, como ha sido claramente demostrado, la presencia de iones [108, 109] o azúcares [110] también pueden afectar la polimerización, así como su comportamiento cromatográfico y su actividad biológica [111-114].

La purificación también puede complicarse por la presencia en el extracto de más de una forma de la lectina. Estas formas, denominadas isolectinas, tienen la misma especificidad y similar, pero no idéntica, estructura [10] y han sido identificadas en varias fuentes, por ejemplo: Dolichos biflorus [115], Lens culinaris [116,117], Phaseolus lunatus [118], Ph. vulgaris [119-121], Glycine max [122-123], Triticum vulgare [31,124] y Dictyostelium purpureum [125]. Por otro lado, aunque poco frecuente, en la misma fuente se pueden encontrar lectinas con diferentes estructuras y especificidad, ejemplo de ellas son: Manduca simplicifolia [126], Ulex europaeus [127,128], Vicia cracca [129-132], Machaerocera cruce [33] y Histaria floribunda [133-135].

1.4. ESTRUCTURA.

La única característica común de las lectinas es su naturaleza protéica, ya que varían en composición, peso molecular, número y estructura de subunidades y número de sitios de unión por molécula. Más aún, se ha demostrado que las lectinas no tienen

Introducción

una estructura común que funcione como característica de unión [136].

Mientras que muchas lectinas no contienen cisteína, WGA [137,138], STA [31] Y PWM [139,140] son muy ricas en éste aminoácido. Varias lectinas son glicoproteínas y algunas tienen un alto contenido de azúcares como en el caso de STA, que contiene un 55%. Por el contrario, ConA, WGA y PNA no contienen carbohidratos unidos covalentemente. El peso molecular de las lectinas varía desde 36 Kda para WGA [138] hasta algunos cientos de Kda, como la lectina de Ph. lunatus de 265 Kda [141] y la de Limulus polyphemus de 335 Kda [142].

Aunque la mayoría de las lectinas están constituidas por subunidades, el número de éstas puede variar: WGA tiene dos [138,143], HPA tiene seis [64] y LPA tiene 18 [72,142]. Generalmente las subunidades de las lectinas son idénticas entre sí, sin embargo se conocen varios ejemplos donde éstas son diferentes: en el caso de SBA [144] y DBA [145] sus subunidades sólo difieren un poco, pero en otros casos tienen marcadas diferencias, por ejemplo en su peso molecular: 18 y 7 Kda para LCA [146]. Generalmente hay un sitio de unión por subunidad, sin embargo WGA tienen dos [138,147,148], mientras que, por otro lado, SBA [149] y PSA [150] tienen dos sitios de unión en cuatro subunidades. Por su parte, el sitio de unión varía en dimensiones desde aquella que corresponde aparentemente a un monosacárido simple, por ejemplo en SBA [151], o un disacárido como en PNA [152,153] hasta aquellas que ofrecen un sitio más extenso como WGA [137] o PHA [154].

Es importante mencionar que las lectinas que tienen especificidad similar hacia monosacáridos pueden diferir en su afinidad por disacáridos, oligosacáridos y glicopéptidos. Por ejemplo, ConA y LCA, ambas inhibidas en forma similar por manosa y glucosa, presentan diferentes grados de inhibición cuando se hacen reaccionar con glicopéptidos de ovalbúmina o de transferrina [155]. También se observan diferencias entre estas lectinas en su

Introducción

interacción con la superficie de eritrocitos; mientras que ConA se une exclusivamente a una glicoproteína de la membrana (proteína III), LCA se une a ésta y a la glicoforina [156,157].

La necesidad de metales para la actividad de las lectinas se ha observado en algunos casos como los de ConA [158,159], PHA [160], PSA [113] y PLA [111,141], sugiriendo que son metaloproteínas. En el caso de otras lectinas los resultados son contradictorios y el requerimiento de metales no ha quedado bien establecido.

1.5. FUNCION.

Pese a la gran cantidad de investigaciones sobre la localización, purificación y caracterización de las propiedades químicas, físicas y biológicas, la función de las lectinas no se ha podido establecer totalmente. En algunos casos se puede proponer una función basándose en la localización y/o propiedades, pero no dejan de ser ejemplos y mayores esfuerzos deberán realizarse para establecer con precisión el papel que estas proteínas tienen en los seres vivos. Por otro lado, aunque las lectinas son predominantemente intracelulares, también se pueden localizar en las superficies o extracelularmente y éstas parecen estar destinadas a interactuar con sacáridos complementarios localizados en las superficies celulares, en el material extracelular o en soluciones. La mayoría de los estudios que intentan definir el papel biológico de las lectinas se ha desarrollado con éste material exógeno, por lo que sus funciones intracelulares están, aún, más lejos de definirse.

Una posible función de las lectinas, que ha recibido mucha atención, es su participación en la unión de bacterias fijadoras de nitrógeno a las raíces de las leguminosas. En esta reacción, la bacteria del género Rhizobium, se une a la superficie de células diferenciadas de la raíz y se internalizan para formar el

Introducción

nódulo fijador de nitrógeno [161]. Esta simbiosis es específica, ya que ciertos Rhizobium únicamente pueden asociarse con una especie particular de leguminosa [162,163] y la unión puede ser inhibida por el azúcar complementario [164]. Por otro lado, se ha demostrado la presencia de lectinas en tejidos aéreos de las plantas, las cuales difieren de aquellas localizadas en las semillas [162] y, aunque se han presentado evidencias que sugieren su regulación y expresión [165,166], su función no se ha podido establecer. Además se ha observado que, durante la infección por hongos, la cantidad de lectina en hojas y tallos se incrementa [167,169] lo que sugiere que las lectinas tienen un papel en los mecanismos vegetales de defensa contra agentes infecciosos.

Los mohos han sido de utilidad para sugerir otra de las posibles funciones de las lectinas, debido a que al diferenciarse de una forma vegetativa a una forma agregada y adhesiva presentan, entre otros cambios celulares, un incremento en la síntesis de lectina la cual puede llegar a constituir el 1% del contenido proteico total y puede ser detectada en la superficie celular [42,170,171]. Por otro lado, se puede observar la formación de rosetas cuando se incuban eritrocitos y el moho en presencia de la lectina [170,172] lo cual indica que en la superficie del moho existen receptores para la lectina. Lo anterior sugiere que la lectina es necesaria para la formación de agregados celulares.

La existencia de lectinas en animales es conocida desde el descubrimiento de una aglutinina en la hemolinfa de L. polyphemus. Debido a que esta proteína circulante es capaz de aglutinar agentes patógenos se le ha atribuido una función protectora [173]. Sin embargo, los estudios enfocados a determinar el papel biológico de las lectinas en sistemas animales se han dirigido por dos hipótesis. Una propone la utilización de las lectinas en la pinocitosis mediada por receptores para glicoproteínas parcialmente degradadas en el proceso de catabolismo; la otra propone que las lectinas en los vertebrados puede tener un papel en las interacciones intercelulares durante la diferenciación tisular.

Introducción

La participación de las lectinas en la pinocitosis ha sido revisada [174] y los experimentos se basan en la unión de asialoglicoproteína por células hepáticas de conejo [79,175], donde se pudo aislar y caracterizar la lectina hepática [176] la cual, además, puede inducir mitosis en linfocitos periféricos [177]. Cuando anticuerpos anti-lectina se introducen vfa vena porta a un hígado de rata aislado y perfundido, antes de la inyección de asialcorosomucoide o bilirrubina, el influjo de asialcorosomucoide se reduce en un 88%, mientras que la incorporación de bilirrubina no se afecta [178].

La otra hipótesis se ve apoyada al observar que los niveles de lectina en el músculo pectoral del embrión de pollo se elevan en el momento en que éstas células se fusionan para formar miotúbulos multinucleados [179,180] y porque, aunque la mayoría de la lectina es intracelular, ésta puede ser detectada extracelularmente durante este proceso [68,181]. Una prueba directa es que el tioidgalactósido, un potente inhibidor de la lectina, puede bloquear la fusión de mioblastos *in vivo* [182]. Otras pruebas y la definición de posibles vfas por las cuales las lectinas participan en la diferenciación celular han sido presentadas con mayor detalle [183].

Por otro lado, existen evidencias indicando que las lectinas participan tanto en la prevención de infecciones en plantas [147] como, paradójicamente, en la facilitación de infecciones bacterianas en células animales [184-186]. En el último caso, las lectinas bacterianas aparentemente son los mediadores de la adhesión del microorganismo a oligosacáridos de las células animales, como un paso inicial de la infección [184-186]. En resumen, parece ser que las lectinas poseen diferentes funciones en los diversos sistemas estudiados, por lo que únicamente comparten su característica de unirse a azúcares ya que, además, difieren en estructura, composición, especificidad y localización.

1.6. EL GÉNERO PHASEOLUS.

Muchos extractos del género Phaseolus han mostrado poseer capacidad hemaglutinante, los cuales pueden dividirse, de acuerdo a su especificidad, en dos grupos: uno representado por Ph. vulgaris, cuyos miembros aglutinan sin diferencias significativas todos los tipos de eritrocitos humanos y otro, con especificidad para eritrocitos "A", representado por Ph. lunatus. Se podría definir un tercer grupo, caracterizado por la ausencia de capacidad aglutinante [187].

Aunque muchas lectinas del género Phaseolus son similares en peso molecular y en estructura de sus subunidades, se han encontrado diferencias en el contenido de carbohidratos, propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas, las cuales pueden deberse a factores genéticos, diferentes métodos de purificación, identificación impropia de las especies y variedades, y un inadecuado criterio de homogeneidad. Por otro lado, los estudios bioquímicos sobre estas aglutininas se han complicado por el gran número de variedades existentes, principalmente de Ph. vulgaris.

Riggs y Osgood en 1955, obtienen de Red Kidney la fitohemaglutinina (PHA), una proteína que es homogénea por electroforesis, posee 3.4% de sustancias reductoras, un pI de 6.5 [188] y la capacidad de inducir transformación blastoide [22]. Una purificación posterior de la lectina [189] indicó que la molécula tiene un peso molecular de 129 KDa y que contiene alanina como aminoácido N-terminal, es rica en ácido aspártico, leucina, serina, y treonina; pero no contiene aminoácidos azufrados.

A partir de la fitohemaglutinina comercial (PHA-P), por cromatografía en carboximetil-celulosa (CM-celulosa) y Sephadex G-15B, se pueden separar fracciones con diferentes actividades. Una de ellas, denominada leucoaglutinina (L-PHA), presentó alta capacidad leucoaglutinante y mitogénica; mientras que otra,

Introducción

llamada eritroaglutinina (H-PHA) presentó alta capacidad eritroaglutinante, pero baja actividad con leucocitos [190]. La lectina de Red Kidney también ha sido aislada por cromatografía de afinidad utilizando tiroglobulina porcina [191] o fetuina [192] conjugada a Sepharose y, cuando posteriormente se separan por cromatografía de intercambio iónico, se producen cinco proteínas distintas cada una con un peso molecular de 115 ± 4 KDa [193].

Si bien los primeros intentos para separar los diversos componentes responsables de las propiedades biológicas de las lectinas de Red Kidney dieron resultados contradictorios, los trabajos que demostraron la presencia de dos tipos de subunidades, designadas como L y E (esta última también denominada R), aclararon muchas dudas [120, 194-199]. Estas subunidades se combinan para dar una familia de cinco proteínas, cada una formada por cuatro subunidades unidas por enlaces no covalentes [120, 194-198, 200, 201].

Las subunidades pueden distinguirse entre ellas por su secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal, pI y propiedades biológicas [120]. La subunidad L, con serina como aminoácido N-terminal y un pI de 5.25, muestra una fuerte afinidad por los receptores presentes en la membrana de los linfocitos, pero baja por los eritrocíticos [120, 199]; mientras que la subunidad E, tiene alanina como aminoácido N-terminal, posee un pI de 5.95 y presenta alta afinidad por receptores de los eritrocitos [198].

Cada isolectina contiene diferente cantidad de subunidades L y E por lo que, como consecuencia de la especificidad, el tetramero de subunidades L, la leucoaglutinina, tiene alta actividad leucoaglutinante; mientras que la eritroaglutinina, formada por cuatro subunidades E, tiene alta capacidad eritroaglutinante. Tres proteínas intermedias son tetrameros que contienen varias proporciones de cada subunidad: LE_3 , L_2E_2 , y L_3E . La mezcla de actividades que poseen estas isolectinas reflejan su estructura híbrida y la inducción de mitosis por estas proteínas es proporcional al contenido de las subunidades L.

Introducción

Lectinas de otras variedades de Ph. vulgaris han sido aisladas y caracterizadas. Del frijol llamado Wax (Ph. vulgaris var. sure crop stringless wax) se ha purificado una hemaglutinina cuya composición de aminoácidos es similar a la de Red Kidney, ya que no contiene aminoácidos azufrados y tiene altas proporciones de ácido aspártico, serina y treonina, tiene un peso molecular de 132 KDa y contiene 10.4% de azúcares totales [202]. De otra variedad, Ph. vulgaris var Brittle-wax, se aislaron dos hemaglutininas tetraméricas con un peso molecular de 125.5 KDa, las cuales son mitogénicas y tienen la propiedad de reaccionar con células transformadas a concentraciones 100 veces menores que las necesarias para células normales [192].

A partir de Ph. vulgaris var. Blue Lake, se han aislado dos lectinas [203]. Una de ellas, la PHA-a", ha sido purificada en forma homogénea y tienen un peso molecular de 83 KDa, por lo que es considerablemente menor que otras lectinas del mismo género; posee capacidad mitogénica, eritro y leucoaglutinante y los intentos para separar estas actividades han fracasado [203,204]. De Ph. vulgaris var Navy se aisló una lectina la cual se parece a la PHA en peso molecular, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos, sin embargo presenta alta capacidad eritro y leucoaglutinante en la misma molécula [205].

Otras variedades de Ph. vulgaris, cuyas lectinas han sido aisladas son: Garbancillo [93], Red Kidney "Haricot" [121], Black Kidney [206], Pinto III [207], Tora [208], Rico 23 [209] y Red [210].

Por otro lado, de las semillas de Phaseolus coccineus var scarlet runner, utilizando precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico, se han aislado dos lectinas [211]. Ambas tienen un peso molecular de 120 KDa y están constituidas por cuatro subunidades idénticas, presentan actividad hemaglutinante hacia cualquier tipo de eritrocitos, son inhibidas por N-Ac-Gal y por un glicopeptido aislado de la membrana del eritrocito humano [212]. Sin embargo, solamente una

Introducción

de ellas es mitogénica y la razón precisa de esta diferencia es desconocida. A partir de Ph. coccineus var alubia se aisló por cromatografía de afinidad una lectina con peso molecular de 112 KDa, cuatro subunidades idénticas, 20% de azúcares totales, pero no pudo ser inhibida por N-Ac-Gal y algunas glicoproteínas probadas [213]. Desafortunadamente su actividad mitogénica no ha sido estudiada.

La aglutinina de Ph. lunatus (sinónimo Ph. linpis) fue la primera lectina que mostró especificidad para un tipo sanguíneo [11] y su actividad hemaglutinante radica en dos especies moleculares, cada una con la misma composición de aminoácidos y carbohidratos; pero una de ellas tiene un peso molecular de 124 KDa, mientras que la otra lo tienen de 247 KDa [111, 141, 214]. Por electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS y 2-ME, ambas lectinas producen una subunidad idéntica de 31 KDa; sin embargo en ausencia de 2-ME el peso de las subunidades es de 62 KDa aproximadamente [215]. Por lo tanto, las lectinas son dímeros y tetrámeros de esta subunidad mayor y presentan dos y cuatro sitios de unión, respectivamente [216]. El tetrámero presenta mayor actividad hemaglutinante [215] y mitogénica [217] que el dímero y este cambio de actividad no parece deberse, en forma directa, al incremento de la valencia sino, más bien, a la facilidad o probabilidad de formar puentes entre los receptores celulares.

2.0. PARTE EXPERIMENTAL.

2.1. ANTECEDENTES.

A pesar de la importancia de las lectinas, su amplia utilización en campos como la medicina y la biología y la gran diversidad de fuentes, en nuestro País han sido realmente pocos los trabajos en esta área y los investigadores dedicados a este campo se pueden contar con los dedos de una mano. Una de las mayores aportaciones son los trabajos dirigidos por el Dr. Félix Córdoba, quien en 1969 aisla anticuerpos dirigidos contra el sitio activo de la Con A [218], en 1976 reporta la actividad inmunosupresora de los extractos de Ph. vulgaris var. garbancillo y Ph. coccineus var. alubia [219] y, ultimamente, ha demostrado la presencia de lectinas en los cactus de la península de Baja California Sur [39,220]. Otra importante contribución son los trabajos del Dr. J.L. Ochoa quien no solamente ha purificado lectinas de la flora mexicana [104, 213, 221], sino que además ha postulado alguno de los mecanismos y factores que afectan la interacción de estas proteínas con sus ligandos [136,222,223].

Las lectinas del género Phaseolus han generado gran interés por sus variadas propiedades y las diferencias importantes en especificidad y estructura encontradas en las tres especies estudiadas. Por otro lado, la riqueza de variedades en nuestro País, la oportunidad de describir la primera lectina aislada de Phaseolus acutifolius y la posibilidad de brindar una alternativa a quienes utilizan lectinas, han sido las motivaciones para la elaboración y realización de este proyecto.

Parte Experimental

La semilla objeto de este trabajo fue colectada en el estado de Chiapas donde se le conoce con el nombre de escumite y, su cultivo y consumo están ampliamente difundidos. El nombre genérico de la forma cultivada es Phaseolus scutifolius var. latifolius (224), pero también se le conoce como: tepari, yuri muni y pavi, entre otros nombre que ha recibido.

Siguiendo una técnica descrita para el aislamiento de lectinas del género Phaseolus (184), se utilizó estroma-Sephadex como soporte de afinidad y cromatografía de filtración; sin embargo también fueron necesarios otros procedimientos. En esta tesis se presenta la caracterización de la lectina purificada y se describen algunas de sus propiedades biológicas.

2.2. MATERIALES Y METODOS.

2.2.1. CLASIFICACION. La clasificación fue amablemente llevada a cabo por el Dr. Omar Agundis del Departamento de Control de Malezas del Instituto de Investigaciones Agrícolas de la SARH, a quien se le agradece la información.

2.2.2. PREPARACION DEL EXTRACTO SALINO. Las semillas del frijol fueron finamente pulverizadas y 100 g de la harina obtenida se suspendieron en un litro de solución salina amortiguada con fosfatos y adicionada con 0.1% de azida de sodio (PESA). La suspensión se agitó durante toda la noche a 15°C y posteriormente se filtró en gasa de algodón para eliminar el material grueso. El filtrado se centrifugó a 25,000 g durante 30 minutos a 15°C; el precipitado se descartó y el sobrenadante, referido como extracto salino, se congeló a -40°C hasta su utilización.

2.2.3. PREPARACION DEL ESTROMA. El soporte de afinidad fue preparado siguiendo la metodología descrita por Ochoa y Kristiansen (184). Dos litros de glóbulos rojos humanos tipo "O"

Parte Experimental

fueron lisados por lavados repetidos con agua destilada, centrifugando a 30,000g durante una hora a 10°C. Los 70 ml de paquete obtenidos se resuspendieron en 350 ml de PBSA y se les agregó 70 ml de glutaraldehído al 25% (Eastman), agitando durante 16 horas a 10°C. Para eliminar el glutaraldehído residual, la mezcla se centrifugó a 2,000g durante 20 minutos a 5°C y el paquete se lavó tres veces con PBSA, centrifugando a las mismas condiciones. El paquete finalmente obtenido (40 ml) se resuspendió en 200 ml de glicina 0.5 M y se mantuvo en agitación durante toda la noche. La glicina se eliminó por lavados repetidos con PBSA centrifugando a 2,000g durante 20 minutos. Por último, el estroma se mezcló con 40 ml de Sephadex G-75-120 (Sigma Chem. Co.), se empacó en una columna de 2.6 x 14 cm y se lavó con 250 ml de PBSA y 250 ml de glicina-HCl 0.2 M (pH = 2.5).

2.2.4. FILTRACION EN GEL. La cromatografía de filtración se hizo en una columna de 1.6 x 85 cm empacada con Sephadex G-200-120 (Sigma Chem. Co.) y calibrada con PBSA a un flujo de 5 ml/h.

2.2.5. ELECTROENFOQUE PREPARATIVO. Se preparó una placa de 100 ml de Ultradex[™] y anfolina pH = 3.5-18 (ambos productos de LKB) siguiendo las instrucciones del fabricante. La electroforesis se hizo durante 16 horas a 10°C manteniendo una fuerza constante de 0 Watts. El pH se determinó directamente en la superficie de la placa, la cual fue posteriormente cortada en 36 partes iguales. El gel de cada segmento se lavó con agua destilada y en el eluido se determinó concentración de proteína y actividad hemaglutinante.

2.2.6. DETERMINACION DE PROTEINA. La concentración de proteína se determinó siguiendo el método descrito por Lowry y cols. [225], utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) y albúmina sérica bovina (Sigma Chem. Co.) como proteína de referencia. En las fracciones obtenidas durante los diversos pasos de purificación, la presencia de proteínas se determinó midiendo la densidad óptica a 200 nm.

Parte Experimental

2.2.7. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE. Para determinar la actividad hemaglutinante de las fracciones obtenidas se utilizó la técnica de microtitulación en placa haciendo diluciones seriadas con solución salina amortiguada con fosfatos (0.15 M) + 1 mM de CaCl_2 (pH = 7.2), adicionándole posteriormente glóbulos rojos de burro al 2%. El título se determinó después de dejar reposar la placa una hora a temperatura ambiente. Con la misma metodología se usaron eritrocitos de otras especies para comparar la actividad hemaglutinante de la lectina. La actividad específica es definida como el \log_2 del inverso del título, a una concentración de 1 mg de proteína/ml.

2.2.8. PURIFICACION DE LA LECTINA. El extracto salino se aplicó a la columna de estroma-Sephadex, previamente equilibrada con PBSA y se lavó con la misma solución hasta que la densidad óptica fue cero. La lectina fue eluida lavando la columna con una solución de glicina-HCl 0.2 M (pH = 2.5); las fracciones apropiadas se juntaron y se concentraron con sacarosa. Después se dializó contra PBSA y se aplicó a una columna de Sephadex G-200. Las fracciones que mostraron actividad hemaglutinante se juntaron, se dializaron contra glicina al 1% (p/v) y se mezclaron con el Ultradex y las anfólinas en la placa de electroenfoque. Una vez enfocada, la lectina obtenida se dializó contra agua y, finalmente, se liofilizó.

2.2.9. ELECTROFORESIS. Los estudios electroforéticos se hicieron en placas de poliacrilamida con un gradiente lineal del 4 al 20%, utilizando solución amortiguadora de Tris-glicina-azida (pH = 8.9) siguiendo básicamente la técnica descrita por Margolis y Kenrich [226]. Después del corrimiento, el gel se fijó con una solución de ácido sulfosalicílico al 10% durante 30 minutos. La placa se lavó con agua destilada y se efectuó la tinción durante una hora con azul de Coomassie (Coomassie Blue R-250, Bio-Rad) al 0.2%. El exceso de colorante se eliminó con una solución formada por 25 partes de etanol, 10 partes de ácido acético y 65 partes de agua.

Parte Experimental

2.2.10. ELECTROENFOQUE ANALITICO. Para determinar el punto isoeléctrico y como una prueba de homogenicidad de la lectina se hizo el electroenfoque utilizando Ampholine PAGE-PlatesTM (LKB) con un rango de pH de 3.5 a 9.5 siguiendo las recomendaciones del fabricante para su corrimiento. El pH se determinó directamente en la superficie del gel; el cual, posteriormente, se fijó y tñó del mismo modo como se describe en electroforesis.

2.2.11. ESPECIFICIDAD. Para determinar la especificidad, se incubó toda la noche a 10°C una mezcla de 200 ul de la lectina purificada más un volumen igual de una solución 0.1 M del azúcar a probar. Despues se cuantificó la actividad hemaglutinante por microtitulación, en la forma descrita.

2.2.12. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR. Para calcular el peso molecular de la lectina se utilizó una columna de 1.6 x 86 cm empacada con Sephadex G-200-40 (Sigma Chem. Co.) y calibrada con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M (pH = 7.2). Como proteínas de referencia se utilizaron: IgG, transferrina, BSA, ovoalbúmina y lisozima (Sigma Chem. Co.). La presencia y el peso molecular de las subunidades se determinó utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS) y 2-mercapto etanol (2-ME) siguiendo el método descrito por Weber y Osborn [227]. Como proteínas de referencia se utilizaron: BSA, ovoalbúmina, pepsina, tripsinógeno, beta lactoglobulina y lisozima (Sigma Chem. Co.)

2.2.13. ANALISIS DE AMINOACIDOS. La lectina purificada se hidrolizó en vacío con HCL 6 N durante 24, 48 y 72 horas a 110°C en tubos sellados. El contenido de aminoácidos del hidrolizado se analizó basicamente de acuerdo con el método de Spackman y cols. [228]. Los valores de serina y treonina fueron obtenidos por extrapolación al tiempo cero. El triptofano fue determinado fotométricamente según el método de Bence y Schmid [229].

Parte Experimental

2.2.14. CUANTIFICACION DE AZUCARES. El contenido total de carbohidratos se determinó por el método de fenol-ácido sulfúrico [238] utilizando glucosa como referencia.

2.2.15. ESTUDIOS DE HEMAGLUTINACION. Para definir la influencia de cationes en la aglutinación, se incubaron toda la noche volúmenes iguales de la lectina y EDTA 1 mM. Posteriormente la mezcla se dializó exhaustivamente para eliminar el EDTA; la actividad hemaglutinante se midió adicionando solución 0.5 mM de CaCl_2 , MnCl_2 o MgCl_2 . La influencia de la temperatura se determinó incubando las placas a 4, 10, 24 y 37°C.

2.2.16. ESTUDIOS DE MITOGENICIDAD. Las células fueron obtenidas del bazo de ratones CD-1. Los eritrocitos se eliminaron por lisis con solución de NH_4Cl al 0.9 % y los linfocitos fueron lavados 3 veces con solución balanceada de Hanks y finalmente resuspendidos a una concentración de 5×10^6 células/ml en el medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco) suplementado con suero fetal de ternera al 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina y 2 mM de L-glutamina (Merck). Se incubaron cultivos por triplicado conteniendo 100 μl de la suspensión de linfocitos y 10 μl de diversas soluciones de la lectina o leucoaglutinina (L-PHA), en microplacas (Falcon Plastics) a 37°C en presencia de 5 % de CO_2 durante 72 horas. Seis horas antes de terminar el cultivo, se les adicionó 1 μCi de ^3H -timidina [^3H]-dThd, 2Ci/nmol, New England Nuclear) y la incorporación de tritio en el ADN fue medida según Hartzman y Cole [231]. La incorporación basal fue establecida en forma similar, pero sin lectina. Los valores de incorporación de tritio son reportados como la media de los tres cultivos después de restarle el valor de la incorporación basal.

2.2.17. ESTUDIOS DE INMUNOSUPRESION. Para demostrar el efecto inmunosupresor de la lectina, se siguió la metodología descrita por Calderón y Córdoba [219]. Ratones CD-1 fueron inoculados intraperitonealmente con 0.1 ml de diferentes concentraciones de la lectina o solución salina. Dos días después se inmunizaron por la misma vía con 2×10^6 glóbulos rojos de carnero (GRC) en 0.1

Parte Experimental

mi de PBS. Los animales fueron sacrificados 5 días después de la inmunización y la respuesta inmune humoral se midió por el método de hemaglutinación directa en placa, utilizando PBS como diluyente y GRC al 1.5 %.

2.3. RESULTADOS.

2.3.1. EXTRACCION. El extracto salino obtenido por este procedimiento tienen una concentración de 13.5 mg de proteína por ml y una actividad específica de 11.65 ± 2.45 para cualquier tipo de eritrocitos humanos.

2.3.2. PURIFICACION DE LA LECTINA. Cuando el extracto salino se aplicó a la columna de estroma-Sephadex y ésta se lavó con PBSA, se obtuvo una fracción sin actividad hemaglutinante, como se aprecia en la figura 1. Toda la actividad se localizó en el segundo pico, el cual fue eluido con glicina-HCl. Sin embargo, cuando se analizó por electroforesis se pudo determinar la falta de homogeneidad por lo cual se concentró y se aplicó a una columna de Sephadex G-200. Pese a obtenerse varias fracciones, el 82% de la actividad inicial se recuperó en un sólo pico, como puede verse en la figura 2, con un incremento en la actividad específica de casi 650 veces y, aunque la eliminación de proteínas contaminantes es evidente, el análisis electroforético mostró la presencia de componentes sin actividad hemaglutinante. Por lo tanto, las fracciones con actividad se juntaron y se dializaron contra glicina al 1%, se mezclaron con Ultradex y anfólinas para su separación por enfoque isoelectrico. Mediante este procedimiento se logró la eliminación de proteínas contaminantes (figura 3) y se obtuvo una hemaglutinina enfocada a pH de 5.0 ± 0.2 , cuya actividad se incrementó aproximadamente en un 26%, respecto al paso anterior, y su actividad específica fue 800 veces mayor que la del extracto salino, como se puede apreciar en la tabla 1, donde se presentan los datos obtenidos en los

Parte Experimental

diferentes pasos de purificación. La proteína obtenida mostró ser homogénea, al dar una sola banda por electroforesis y enfoque isoeléctrico en geles de poliacrilamida (figura 4), así como un solo pico en Sephadex G-200 (figura 5).

TABLA I. PURIFICACION DE LA AGLUTININA DE *Ph. acutifolius*.

FRACCION	Actividad Especifica (x10 ⁶)	Factor de Purificación	Actividad Recuperada (%)
Extracto	0.655	---	---
Estroma-Sephadex	347	538	97
Sephadex G-200	422	645	82
Electroenfoco	534	815	69

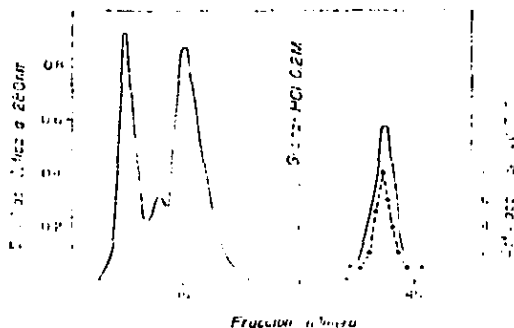


FIGURA 5. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD. 3 ml del extracto salino fueron aplicados en una columna de estroma-Sephadex (1.6x10 cm) previamente equilibrada con PBS. La columna fue lavada con la misma solución y la fracción fue eluido con glicina-HCl 0.2 M (pH 2.5). Manteniendo un flujo de 20 ml/h, a temperatura ambiente, se colectaron fracciones de 5 ml a las cuales se les determinó la absorbancia a 280 nm (línea continua) y la actividad hemaglutinante para eritrocitos de berra (línea - - -).

Parte Experimental

FIGURA 2. FILTRACIÓN EN GEL. La fracción con actividad obtenida de extracto-Schubert se reconcentró y se aplicó a una columna de Schubert 8-200 (1.6x50 cm) aguilardada con PEG. La elución se hizo con la misma solución con un flujo de 5 ml/h. Se colectaron fracciones de 2.5 y se determinó la absorbancia a 280 nm (línea continua) y la actividad hemaglutinante para eritrocitos de burro (O---O) a cada una de ellas.

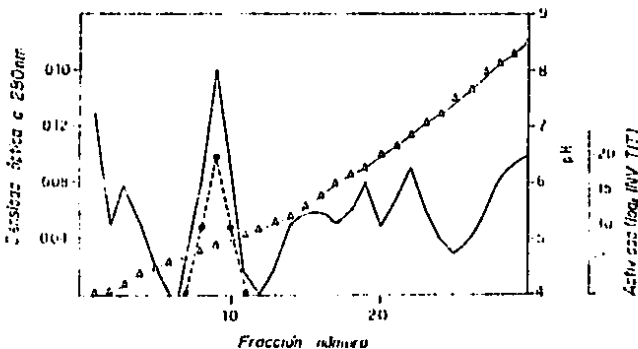
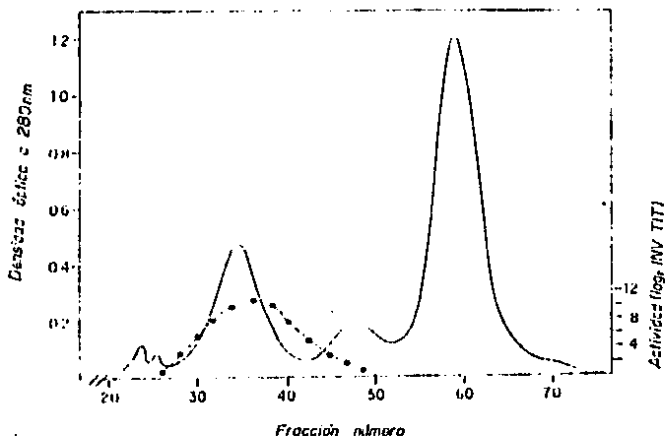


FIGURA 3. ELUOGRAMA POR PERMEACIÓN. Píera de 100 ml de Nitrocelo conteniendo 2% de carboxilato tipo 8-150, fue cargada durante la noche con 5 mg/ml de extracto a 4°C. Después del equilibrio se eluyó con el (O---O) y el pH que corrió en el primer bucle. Las fracciones fueron frías para obtener la actividad. Se determinaron los valores de absorbancia a 250 nm (línea continua) y la actividad hemaglutinante (O---O).

Parte Experimental

FIGURA 4. ANALISIS ELECTROFORNETICO. Electroforesis en gelos de poliacrilamida (I) y electroforesis analitico (II) del extracto salino (a) y de la lectina purificada (b) las condiciones de corriente y tinción está indicadas en materiales y métodos.

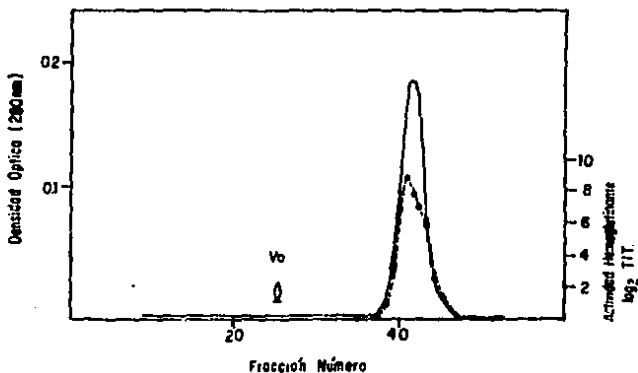
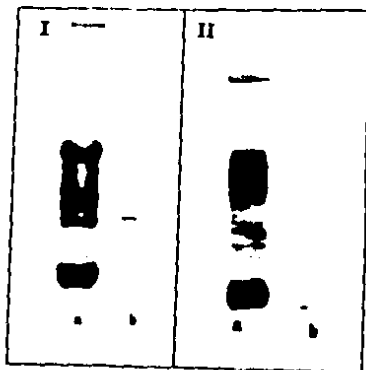


FIGURA 5. ANALISIS CROMATOGRAFICO. La lectina purificada se paso por una columna de Sephadex G-200; la densidad optica a 280 nm (línea continua) y la actividad hemaglutinante para eritrocitos de burro (8--5) fue determinada para cada fracción.

Parte Experimental

2.3.3. PROPIEDADES QUÍMICAS. El peso molecular de la lectina purificada, estimado por filtración en Sephadex G-200, fue de 83 KDa. Por otro lado, utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y 2-ME, se determinó la presencia de un único tipo de subunidades con un peso molecular aproximado de 21 KDa (figura 6). Cuando la muestra se incubó previamente con un agente disociante, pero en ausencia de 2-ME y se efectuó la electroforesis en presencia de SDS, se obtuvo el mismo tipo de subunidades. Lo anterior indica que las subunidades se encuentran unidas por enlaces no covalentes y este resultado es congruente con el obtenido en el análisis de aminoácidos. Por otro lado, la hemaglutinina posee un punto isoeléctrico de 4.9, determinado por electroenfoque analítico en placa.

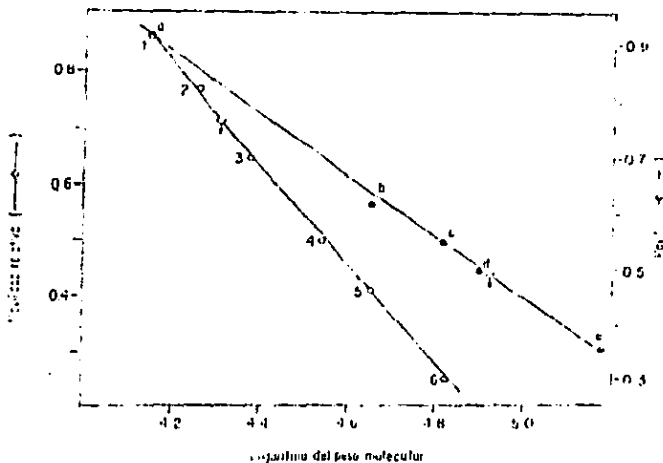


FIGURA 6. ESTIMACION DEL PESO MOLECULAR. El peso molecular de la lectina, determinado por Sephadex G-200 y el de sus subunidades, determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, están indicados por las flechas. Proteínas de referencia: a, limonina; b, ovalbúmina; c, BSA; d, transferrina; e, IgG; f, limonina; g, beta lactoglobulina; h, tripsinógeno; i, papaína; j, ovalbúmina; k, BSA.

Parte Experimental

TABLA II. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA LECTINA DE *Ph. acutifolius*.

Aminoácido	Residuos de aminoácidos mol/83000 g de proteína	(%)
Acido aspártico	88	13.29
Acido glutámico	44	6.65
Alanina	46	6.95
Arginina	16	2.42
Cisteína	00	0.00
Fenilalanina	36	5.44
Glicina	48	7.24
Histidina	48	7.24
Isoleucina	28	4.23
Leucina	64	9.67
Lisina	28	4.23
Metionina	00	0.00
Prolina	24	3.63
Serina	88	13.29
Tirosina	12	1.81
Treonina	56	8.46
Triptófano (=)	12	1.81
Valina	54	8.16
TOTAL	662	

Peso molecular de la parte proteica: 76,486^(a).

(a). Obtenido espectrofotométricamente (299).

(b). Calculado por la suma de aminoácidos individuales de los cuales el agua de hidratación del enlace se sigue restando.

La composición de aminoácidos de la hemaglutinina obtenida de *Ph. acutifolius* se presenta en la tabla II, donde se observa que la proteína no contiene cisteína ni metionina; sin embargo contiene altas proporciones de ácido aspártico, serina, treonina, leucina y valina. El nitrógeno proteico fue recuperado aproximadamente en un 92%, indicando que la lectina contiene 8% de material no proteico. Esto concuerda con los resultados obtenidos por el análisis de carbohidratos, donde se determinó que la lectina es una glicoproteína que contiene un 7.42% de azúcares totales. El peso molecular de la molécula completa, basándose en el número de residuos de aminoácidos y el peso de la fracción sacárida es de 82.9 kDa.

2.3.4. ESTUDIOS DE HEMAGLUTINACION. La lectina de *Ph. acutifolius* varía en su capacidad hemaglutinante cuando se hace reaccionar con eritrocitos de diferentes especies. Como se puede apreciar en la tabla III, la mayor reactividad la presenta con eritrocitos de burro y caballo, la cual es 56 veces mayor que para eritrocitos

Parte Experimental

humanos. Sin embargo, los intentos hechos para inhibir la reacción de hemaglutinación con mono y disacáridos fracasaron. La N-Ac-Gal mostró un efecto mínimo cuando se usaron altas concentraciones (>250 mM).

TABLA III. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA DE *Ph. acutifolius* CON ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES.

Especie	Actividad Hemaglutinante Relativa*
Humano ^a	1.00
Bovino	0.88
Burro	36.22
Caballo	36.22
Carnero	0.44
Cobayo	1.76
Hamster	2.49
Pollo	0.44
Ratón	0.62
Rata	0.62

a. Eritrocitos humanos = 1.
 b. No se observaron diferencias entre tipos sanguíneos.

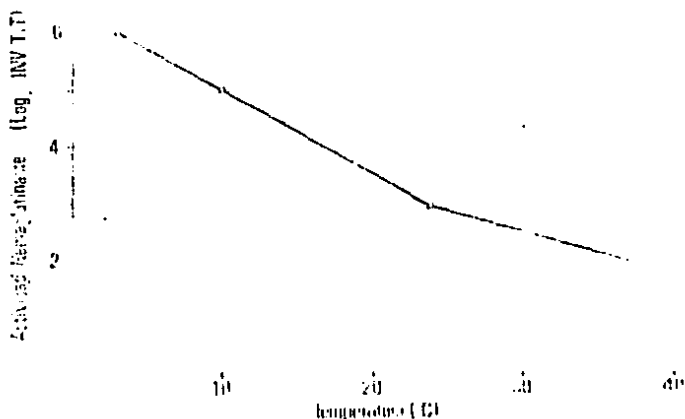


FIGURA 7. EFECTO DE LA TEMPERATURA. La actividad hemaglutinante de la lectina frente a eritrocitos de burro fue medida por microtitulación en placa a 4, 18, 24 y 37°C. Tiempo de incubación: 1 hora.

Parte Experimental

Por otro lado, la actividad hemaglutinante es afectada por la temperatura de incubación y por la presencia de cationes. Como se muestra en la figura 7, la mayor actividad hemaglutinante se manifiesta a 4°C y disminuye al incrementarse la temperatura. La necesidad de cationes se manifiesta porque la lectina pierde su capacidad hemaglutinante cuando se incuba con EDTA (1mM), como se muestra en la tabla IV. Después de eliminar por diálisis el EDTA, la actividad hemaglutinante es de únicamente un 10% de la actividad original, pero puede ser reconstituida casi totalmente por adición de soluciones 0.5mM de CaCl_2 , MgCl_2 o MnCl_2 .

TABLA IV. EFECTO DEL EDTA Y LOS CATIONES EN LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA DE *Phaseolus acutifolius*.

	Actividad Hemaglutinante Relativa*
LECTINA NATIVA	1.00
LECTINA + 1 mM de EDTA	0.10
LECTINA LIBRE DE METAL	0.10
+ 0.5 mM de CaCl_2	0.97
+ 0.5 mM de MgCl_2	0.96
+ 0.5 mM de MnCl_2	0.96

(*) Utilizado eritrocitos de burro.

2.3.5. ACTIVIDAD BIOLÓGICA. Como se puede ver en la figura 8, la lectina purificada es un potente mitógeno que estimula a menor dosis que la L-PHA, pero también con menor intensidad. En los experimentos se determinó que la dosis a la cual la lectina de *Ph. acutifolius* tiene un efecto de máxima estimulación es de 5 µg/ml de cultivo; mientras que para la L-PHA fue de 10 µg/ml.

Por otro lado, la capacidad de inducir inmunosupresión por inoculación previa de la lectina se manifestó al reducir casi a cero la respuesta humoral contra GRC cuando se inocularon 100 µg, como se puede apreciar en la tabla V.

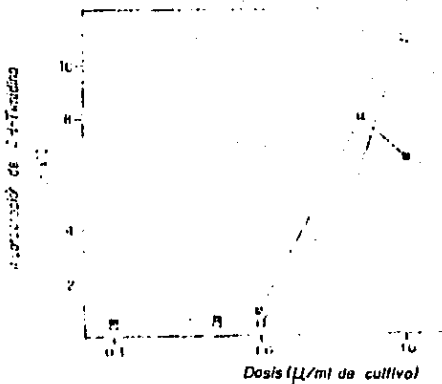


FIGURA 8. MITOGENICIDAD. La capacidad de la lectina de inducir mitosis (O---O) en linfocitos esplenicos de ratón fue determinada por medición de la incorporación de ³H-timidina. Como control se utilizó L-PHA (O---O).

TABLA V. EFECTO INMUNOSUPRESOR DE LA LECTINA DE *Ph. acutifolius* EN RATONES CD-1.

DOSES (µg)	Respuesta Anti-GRC (Log ₂ Titulo)
0	7.29 ± 0.64
25	7.60 ± 0.63
40	4.38 ± 0.82
60	3.33 ± 0.82
80	1.28 ± 0.43
100	0.28 ± 0.10

Grupos de seis animales machos fueron inoculados con 0.1 ml de lectina dos días antes de ser inmunizados con GRC. 5 días después de la inmunización fueron sacrificados y la respuesta inmune humoral hacia GRC fue determinada por hemaglutinación directa en placas.

2.4. CONCLUSION.

La semilla de Phaseolus acutifolius var. latifolius contiene una lectina, la cual es similar en algunas propiedades a otras descritas del género phaseolus. La lectina fue obtenida en forma homogénea como se demostró por enfoque isoeléctrico, electroforesis en geles de poliacrilamida y cromatografía de filtración. El procedimiento de purificación involucra cromatografía de afinidad en estroma-Sephadex, filtración en gel (Sephadex G-200) y electroenfoque. Aunque otros investigadores [10,213] utilizan solamente los dos primeros pasos para la purificación de lectinas, en este caso el enfoque isoeléctrico fue completamente necesario.

El peso molecular aparente de la lectina es de 83 KDa y consta de 4 subunidades de 21 KDa cada una. Carece de cisteína y metionina, mientras que contiene altas proporciones de ácido aspártico, serina y treonina. Lo anterior es una característica que comparte con Ph. vulgaris y Ph. coccineus.

La presencia de metales parece ser importante para la actividad hemaglutinante y esta actividad también puede ser modificada por la temperatura de incubación. Además, presenta diferente actividad específica cuando se hace reaccionar con eritrocitos de diferentes especies. Sin embargo, los intentos hechos para inhibir la reacción de hemaglutinación con azúcares fracasaron y la reacción con fetuina fue muy débil.

Por otro lado, la lectina posee la capacidad de suprimir la respuesta inmune humoral anti-GRC y de inducir transformación blástica en linfocitos esplénicos de ratón.

3.8. DISCUSION.

Los diversos e interesantes efectos de la fitohemaglutininas en células de mamíferos han atraído la atención de muchos investigadores. Por ejemplo dentro de las lectinas de las leguminosas, aquellas aisladas del género Phaseolus además de inducir hemaglutinación tienen otras actividades biológicas tales como la estimulación mitogénica de los linfocitos [193, 232-236], efecto inmunosupresor [219,237] y aglutinación de ciertas células tumorales [238,239].

Varias lectinas del género Phaseolus se han aislado empleando metodología diversa, incluyendo: diferentes formas de extracción, precipitación con sulfato de amonio o variaciones de pH, electroenfoque, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. En la actualidad, posiblemente esta última sea la técnica más utilizada, sin embargo la falta de especificidad de las lectinas del género Phaseolus ha limitado su uso y solamente se han utilizado tiroglobulina [191,240], fetuina [192] y ConA [200] acoplados a Sepharose.

La cromatografía de afinidad utilizando estroma como soporte ha permitido la purificación de algunas lectinas de este género [104,213]. Sin embargo los autores encuentran que de una columna de Sephadex-estroma se eluyen dos fracciones activas: una de ellas es eluida con glicina-HCl y la otra con agua destilada, independientemente del orden en que los eluyentes se apliquen y sin diferencias significativas entre ellas. Así mismo, ellos proponen que este fenómeno se debe a la participación de fuerzas hidrofóbicas en la unión de la lectina con el soporte y otros experimentos realizados apoyan esta idea [222,223,241].

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis difieren de lo anterior ya que únicamente se logró obtener una fracción activa, la cual puede ser eluida de la columna con glicina-HCl o con agua destilada (Figura 9) sin que se pudieran observar diferencias. En forma comparativa se utilizó una columna de Sepharose-fetúina considerando que, si bien la fetúina no es un buen inhibidor de la lectina en la reacción de hemaglutinación, la lectina puede ser retenida en la columna. Se utilizó una columna de Sepharose-fetúina (Sigma Chem. Co.) y cuando se aplica el esquema de elución, se obtienen los resultados de la figura 10, en la cual se demuestra que la lectina realmente puede ser eluida de este soporte con glicina-HCl. Lo anterior indica que la lectina se une en forma diferente o bien que actúan diferentes sistemas de unión con cada uno de los soportes de afinidad empleados debido, posiblemente, a que los componentes de membrana presentes en el estroma modifican la interacción de la lectina con el ligando.

Existen otros reportes que indican la interacción de las lectinas con sustancia no sacáridas. La ConA puede unirse a adsorbentes hidrofóbicos, como los derivados alquil-agarosa [222], y algunas superficies inertes incluyendo: bicapas de fosfolípidos, vidrio y plástico [242-246], pudiendo inducir la formación de vesículas [246] o alterar la presión superficial [243] y estos efectos pueden inhibirse con el azúcar específico, lo cual apoya la idea de que componentes hidrofóbicos participan en la interacción ligando-lectina.

Por otro lado, hablando de las lectinas del género Phaseolus, y en forma concreta de PHA y de ligandos presentes en la membrana de los eritrocitos, Kornfeld y Kornfeld en 1978 aislan un glicopéptido del eritrocito humano que inhibe la actividad hemaglutinante de la PHA; pero la capacidad inhibitoria de este glicopéptido se pierde cuando la molécula es digerida por tripsina [247]. Un resultado similar es obtenido por Strauchen y cols, trabajando con sustancias presentes en la saliva de individuos secretores [248]. Estos resultados indican que la parte protéica tiene un papel importante en la unión de la lectina.

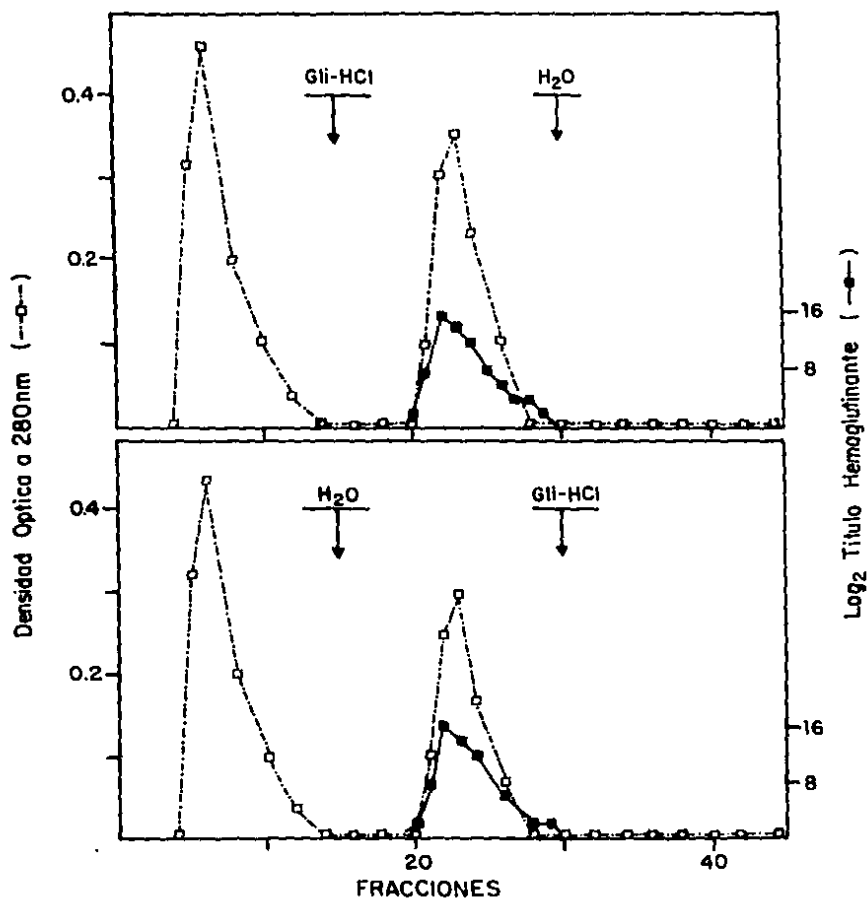


FIGURA 9. ESQUEMA DE ELUCION DE LA LECTINA EN ESTROMA-SEPHADEX. Las dimensiones de la columna y las condiciones de corrimiento se encuentran indicadas en materiales y métodos. El volumen de cada eluyente equivale a 2 veces el volumen total de la columna.

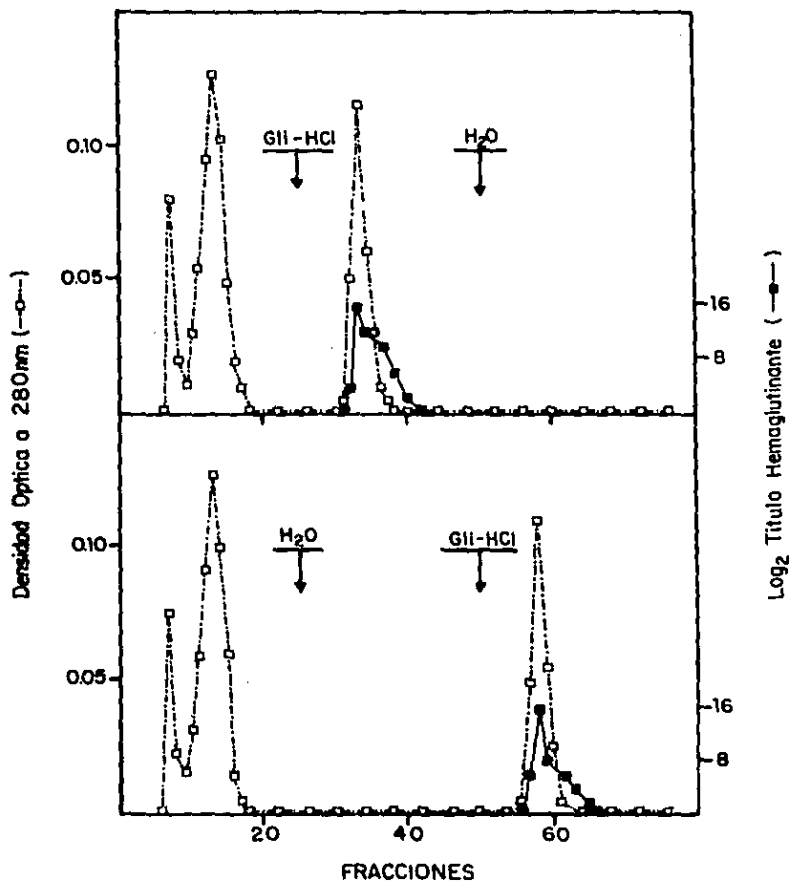


FIGURA 10. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN SEPHAROSE-FETUINA. 100 μ l de extracto salino se aplicaron a una columna de 18 ml de Sepharose-fetuin (Sigma Chem. Co.) empacada y calibrada con PBSA. Se colectaron fracciones de 0.5 ml a las cuales se les determinó densidad optica y actividad hemaglutinante. Las aplicaciones de glicina-HCl y agua estan indicadas.

Discusión

Si bien algunas lectinas, incluyendo de Phaseolus, se pueden aislar por cromatografía de afinidad en un sólo paso, otras han requerido procesos de purificación adicionales. Para las lectinas del género Phaseolus se ha utilizado muy poco la cromatografía de intercambio iónico, sin que la razón se pueda precisar; pero en aquellos trabajos donde ha sido empleada, se ha podido demostrar la presencia de más de una forma de la lectina (isoelectinas). De igual modo, en este trabajo no se utilizó el intercambio iónico; pero en otros experimentos hechos con Phaseolus vulgaris var. cacahuete hemos observado que una fracción obtenida de estroma-Sephadex puede separarse en, cuando menos, tres fracciones con actividad hemaglutinante cuando se pasa por una columna de DEAE-celulosa.

En la purificación de la lectina de Ph. acutifolius, después de la cromatografía de afinidad en estroma, fue necesario emplear la cromatografía de filtración en gel, ya que se habían obtenido varias bandas cuando la fracción activa se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida. Incluso después de la filtración en gel, la muestra continuaba siendo heterogénea y solamente después del electroenfoque se logró la homogeneidad, la cual es demostrada por filtración en gel, electroforesis y enfoque isoelectrico (figuras 4 y 5). Sin embargo, aunque los criterios de homogeneidad presentados aquí son suficientes para indicar la pureza de la muestra, debe iniciarse la identificación de las isoelectinas y la separación de sus componentes hemaglutinantes, inmunosupresores y mitogénicos, si existen.

Al igual que las lectinas aisladas de Ph. vulgaris y Ph. coccineus, la lectina aislada de Ph. acutifolius es una lectina no específica, es decir, no diferencia tipos sanguíneos humanos.

Cuando la lectinas, aislada en este trabajo, se compara con otras del mismo género se aprecian diferencias y similitudes importantes (ver tabla VI) en sus propiedades físicas y químicas. Por otro lado, como se puede observar en la tabla VII, la similitud en el contenido de aminoácidos entre Ph. acutifolius,

Discusión

Ph. vulgaris y Ph. coccineus es notoria y se manifiesta por la ausencia de aminoácidos azufrados / elevadas proporciones ácido aspártico, serina y treonina. La ausencia de cisteína indica que la formación de puentes disulfuros entre cadenas esta mediada por enlaces no covalentes. Esto pudo verificarse para la lectina de Ph. acutifolius ya que cuando se incubó la proteína y se corrió la electroforesis en presencia de SDS, pero en ausencia de agentes reductores (2-ME), se obtuvo una banda de 21 Kda aproximadamente.

TABLA VI. COMPARACION DE LA LECTINA DE Phaseolus acutifolius CON OTRAS DEL MISMO GENERO.

	P.M. (KDa.)	P.I.	A% (280 nm)	Azúcares Totales (%)
<u>Ph. acutifolius</u> <u>latifolius</u>	83	4.9	9.78	7.42
<u>Ph. coccineus</u> Alubia	112	4.5-5.5	nd	18.88
Scarlet Runner	128	6.9	nd	9.83
<u>Ph. lunatus</u> Lima I	124	nd	12.38	6.45
Lima II	247	nd	12.38	6.45
<u>Ph. vulgaris</u> Black	126-138	4.9	nd	5.78
Blue Lake a"	83-91	nd	10.58	12.91
Navy	112-115	nd	10.26	6.49
Pinto III	52-55	4.7-5.8	nd	9.5-17.1
Red Kidney	126	5.1	11.48	8.88
Rico 23	188	5.1	7.35	18.35
Tora	128	5.5	12.78	7.89
Max	121-132	5.5	12.48	16.48

nd = no determinado.

Se ha reportado que muchas lectinas son metaloproteínas [3] y que estos metales son necesarios para las actividades de hemaglutinación, precipitación de polisacáridos y transformación de linfocitos [13,249]. La actividad de la lectina fue

Discusión

fuertemente inhibida por EDTA (tabla IV) pero la actividad puede recuperarse por adición de cationes, lo cual indica que tales iones son requeridos, cuando menos, para la reacción de hemaglutinación. Por otro lado algunos estudios hechos en la cinética de la hemaglutinación por lectinas [250,251] revelan que la velocidad de aglutinación mediada por ConA disminuye marcadamente al descender la temperatura, mientras que la aglutinación mediada por SBA se incrementa conforme la temperatura de incubación disminuye. La actividad hemaglutinante de la lectina de *Ph. acutifolius* es modificada por la temperatura de incubación (figura 7) de igual forma que la SBA, es decir se incrementa al descender la temperatura .

TABLA VII. NUMERO DE RESIDUOS DE AMINOACIDOS DE ALGUNAS HEMAGLUTININAS DEL GENERO PHASEOLUS.

	acutifolius		coccineus			vulgaris			
	Intifolius	Aguila	Scarlet	Kidney	Blue Lake	Box	Rico 23	Mayy	Yoro
ALA	66	25.0	60.6	63.0	51.6	62.1	51.0	49.7	79.3
ARG	16	13.4	20.3	24.2	20.1	20.0	18.2	16.0	25.0
ASP	60	60.6	125.0	174.1	93.3	152.0	94.0	116.0	150.1
CYS	60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	trazas	0.0
PRO	24	20.0	52.1	69.3	26.5	67.0	43.6	45.5	64.0
GLU	40	25.0	67.4	90.1	70.0	74.3	32.0	57.7	84.1
GLN	44	60.3	57.0	71.5	56.1	67.7	51.7	40.2	65.1
HRG	40	4.3	10.2	6.2	12.0	0.9	0.4	12.2	12.1
ILE	20	26.9	51.5	97.6	23.1	43.3	41.9	37.2	42.4
LEU	64	33.0	83.9	97.6	53.1	86.0	60.4	67.6	90.6
LIS	20	26.7	47.8	26.0	40.0	26.2	26.0	25.4	47.7
MET	20	0.0	trazas	0.0	2.0	0.0	0.0	trazas	0.0
VAL	24	22.4	37.7	30.9	24.3	40.0	24.0	31.2	40.0
THR	20	67.2	106.9	124.3	72.2	115.0	111.1	80.4	124.0
TRP	12	13.4	20.1	7.0	22.0	10.9	15.6	10.2	15.4
TYR	30	53.0	107.9	92.1	77.0	83.7	74.0	71.2	103.2
ASP	12	13.4	13.9	21.6	17.9	25.1	17.5	20.3	26.4
VAL	54	44.0	74.6	91.7	47.1	80.3	50.9	41.3	64.7

Desde que Nowell publicó la actividad mitogénica de la PHA [22] muchos investigadores han estudiado los efectos de las lectinas en células linfocíticas debido a que además de inducir mitosis se pueden utilizar para la separación de poblaciones linfocitarias [252-256], para aislar receptores y antígenos de la membrana de los linfocitos [255-258], para la producción *in vitro* de

Discusión

interleucinas, interferón, linfoquinas y otros factores celulares [259-270] y como modelo para estudiar los mecanismos de estimulación y regulación del aparato inmune. Esto último es posible porque los cambios morfológicos y eventos bioquímicos que ocurren durante la activación de linfocitos por lectinas son semejantes a los que ocurren en la estimulación por el antígeno [271,272] con la ventaja de que las lectinas estimulan entre el 70 y el 80% de las células, mientras que el antígeno estimula una proporción bastante menor (0,02-0,2%).

Algunos trabajos [273-276] indican que ConA, PHA y PWM pueden estimular a los linfocitos B, otros [277-283] han demostrado claramente que estos mitógenos únicamente pueden estimular a los linfocitos T. Sin embargo la estimulación de las células B por PWM y PHA es posible cuando son cultivadas en presencia de linfocitos T irradiados [278,281, 283-286], tanto en sistemas autólogos como en alogénicos. Por otro lado, en el caso de ConA, el sobrenadante de los cultivos de linfocitos T es capaz de generar en el linfocito B una respuesta al mitógeno [287,288].

Existen evidencias que sostienen que las células T colaboran en la activación del linfocito B al presentar el antígeno en una forma concentrada [289-291] y algunos experimentos efectuados con lectinas apoyan esta idea ya que, tanto la ConA localmente concentrada [287,292], como la PHA acoplada a Sepharose [293], son capaces de estimular a las células B.

Cuando los linfocitos son activados por lectinas se observan varios eventos bioquímicos. Algunos se manifiestan en los primeros minutos y parecen estar asociados a la transmisión de mensajes para la proliferación celular [294,295]. Los fenómenos iniciales son: a) el incremento en el recambio de fosfatidilinositol [296,297], b) el recambio y síntesis de fosfatidilcolina [298,299] y c) el recambio de las cadenas de ácidos grasos de fosfatidilcolina y otros fosfolípidos.

Discusión

Esto último sugiere que la síntesis de novo de fosfatidilcolina es un evento inicial en la activación del linfocito [300], pero no necesario ya que, aunque la síntesis de fosfatidilcolina se inhiba, no se afecta la blastogénesis [301].

Los cambios en el metabolismo de fosfolípidos membranales observados se han relacionado con el incremento de la fluidez de membrana y los cambios en la permeabilidad [264] que se observan. Posteriormente, se incrementa la concentración intracelular de AMPc, la síntesis de proteínas y ARN, así como la actividad de la ornitina descarboxilasa y la S-adenosilmetionina descarboxilasa [264, 302-305]. Por último se observa un incremento en la síntesis de ADN, medido por la incorporación de ³H-dTh.

La proliferación de linfocitos T inducida por lectinas, parece ser el resultado de dos eventos diferentes [306,307]. El primero es la expresión de receptores para la interleucina 2 (IL-2) la cual no requiere interacción con alguna otra células [308] y el segundo es la producción de IL-2 por otra célula T, la cual únicamente puede ser activada después de interactuar con el monocito [306]. Los diferentes requerimientos de células accesorias, sugieren que ambos eventos requieren señales cualitativamente diferentes; pero una alta producción de IL-2 se puede inducir en ausencia de monocitos adicionando interleucina 1 [309] o utilizando altas concentraciones de ConA.

Por otro lado, sin embargo, las altas concentraciones de ConA necesarias para que la producción de IL-2 sea independiente tienen un efecto tóxico, por lo que en condiciones fisiológicas el requerimiento de células accesorias parece ser indispensable. Para PHA la situación es ligeramente diferente ya que induce agregación, un proceso estrechamente ligado a la activación [310,311], a concentraciones no tóxicas y sin necesidad de células accesorias [311]. Así, es probable que la proliferación inducida por PHA sea menos dependiente [311,312] o totalmente independiente [313] del monocito.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Discusión

Las células T han manifestado poseer actividades de supresión y ayuda y, las pruebas indican que, estos efectos radican en distintas subpoblaciones distinguibles principalmente por la sensibilidad a radiaciones y marcadores de membrana [314-322]. Por su parte, probablemente la inhibición o estimulación de la respuesta inmune por mitógenos sea una función de factores solubles producidos por las células T, las cuales se han descrito como supresores [271, 272, 323, 324] o estimuladores [325-327] de la síntesis de anticuerpos por el linfocito B, así como de la inmunidad celular [259, 260, 328].

Los experimento in vivo, hechos para evaluar los efectos de ConA y PHA en el sistema inmune han dado resultados contradictorios. Algunos investigadores han mostrado el efecto inhibitor [319, 330], mientras que otros han mostrado efectos estimuladores [331, 332]. Por ejemplo, se ha comunicado que ConA suprime la formación de anticuerpos [330, 333], evita la hipersensibilidad tardía [334] y prolonga la sobrevida del injerto de piel [335, 336]; mientras que otros estudios han mostrado que ConA estimula la respuesta inmune humoral [332, 337] y celular [338]. Por su lado, la PHA ha mostrado actividad supresora de la respuesta inmune celular como en: el rechazo de injertos [339-343], hipersensibilidad tardía [344, 345] y el rechazo injerto contra huésped [346, 347]. Sin embargo algunos trabajos reportan que estimula la respuesta humoral [329, 348-351].

Las contradicciones en los resultados indican que los fenómenos de supresión y estimulación de la respuesta inmune son complejos, incluso experimentos recientes hechos con poblaciones purificadas presentan la misma confusión. En algunos casos se observa que el fenómeno de inmunosupresión es dependiente del tiempo y otros de la concentración del mitógeno empleado, o bien de ambos factores [219]. Por último, debe considerarse que el macrófago también es modificado en su fisiología por el estímulo de lectinas y se manifiesta por la estimulación de la endocitosis [352], formación de vesículas citoplasmáticas [352, 353] y la estimulación de la adenilato ciclasa [354].

Discusión

La lectina de Ph. acutifolius, aislada en este trabajo, comparte las características mitogénicas e inmunosupresoras con otras lectinas, especialmente con Ph. coccineus (211,212), Ph. lupinus (141,214,217) y algunas variedades de Ph. vulgaris (22, 93, 192, 193, 199, 203, 207-209). Esto fue demostrado por la incorporación de ³H-dTh en linfocitos esplénicos de ratón (figura 8) y por la disminución de la respuesta humoral anti-GRC (tabla V). Aunque la población linfocitaria estimulada no se identificó se presume, por comparación con otros phaseolus, que son las células T y experimentos dirigidos a demostrarlo deberán realizarse.

Pese a toda la información existente sobre los efectos de las lectinas en el sistema inmune, el mecanismo de supresión no se ha aclarado y, sin lugar a dudas, otros experimentos habrán de realizarse para precisar la(s) células(s) blanco, la forma de interacción de la lectinas con las células y la cinética de estimulación con la finalidad de encontrar una explicación al mecanismo de la inmunosupresión mediada por lectinas.

4.0. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bahala, G. (1957). *Ann. Rev. Exp. Biol. Med.* 34: 682-695.
- 2.- Bayle, G.C. y Sharpleigh, E.J. (1950). *Science* 111: 419.
- 3.- Goldstein, J.I. y Bayle, G.C. (1970). *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 25: 127-346.
- 4.- Hamilton, G.H., Kinsinger, J.J. y Shanon, L.H. (1977). *Plant. Physiol.* 64: 194-197.
- 5.- Liu, H. y Shanon, L. (1971). *In The Antigens*. (Sela, H. Ed). Vol. 15. Academic Press N.Y. pp: 429-579.
- 6.- Liu, H. y Ery, T.E. (1972). *Lymphocytes Reactions*. North Holland, Amsterdam, Academic Press.
- 7.- Genderson, J.L. y Rosenzweig, S.J. Editors. (1974). *Histopus in Immunology*. Academic Press, N.Y.
- 8.- Hild, G.H.G. (1959). *Br. Med. Bull.* 15: 183-186.
- 9.- Bayle, G.C. (1943). *Ver. Sag.* 31: 1-32.
- 10.- Shanon, L. y Liu, H. (1972). *Science* 177: 909-909.
- 11.- Bayle, G.C. y Dequeza, H.M. (1969). *J. Immunol.* 62: 333-339.
- 12.- Frankson, K.G. (1968). *Ann. Rev. Exp. Biol. Med.* 24: 66-72.
- 13.- Allen, H.W. y Whittlington, L. (1967). *J. Immunol.* 102: 1299-1299.
- 14.- Sims, G.R. y Sawyer, R. (1975). *Blood Group in Man*. Ed. H. H. Himmelfarb, Oxford and London. pp: 1-637.
- 15.- Judd, G.J. (1968). *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1: 171-210.
- 16.- Bayle, G.C. y Goldstein, J.I. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 1986-1916.
- 17.- Bayle, G.C. y Goldstein, J.I. (1975). *J. Biol. Chem.* 250: 6857-6860.
- 18.- Judd, G.J., Galsano, G.A., Frickman, P., Bayle, G.C. y Goldstein, J.I. (1976). *Ver. Sag.* 36: 261-267.
- 19.- Goldstein, H.W. y Shanon, L.H. (1977). *Antigen* (London) 16: 623-666.
- 20.- Shanon, L.H. y Goldstein, H. (1974). *In The Antigens*. (Sela, H. Ed). Vol. 2. Academic Press N.Y. pp: 79-160.
- 21.- Judd, G.J. (1977). *Transfusion* 19: 760-772.
- 22.- Hamill, P.C. (1968). *Cancer Res.* 28: 662-666.
- 23.- Gell, J.C., Sanfer, H.W. y Cole, H.G. (1964). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50: 294-297.
- 24.- Sawyer, H.W. y Goldberg, H.S. (1967). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54: 279-284.
- 25.- Sawyer, H.W. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66: 996-1001.
- 26.- Fisher, H. y Sachs, L. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66: 1418-1423.
- 27.- Bayle, G.C., Liu, H. y Shanon, L. (1970). *J. Immunol.* 105: 287-279.
- 28.- Liu, H. y Shanon, L. (1972). *Ann. Rev. Biochem.* 41: 561-576.
- 29.- Smith, H.J. y Ganes, H. (1976). *Biochem. Biophys. Acta* 461: 240-274.
- 30.- Bayle, G.C., Schrammberger, E. y Shanon, L. (1976). *Biochem. J.* 160: 379-382.
- 31.- Allen, H.W. y Shanon, L. (1973). *Biochem. J.* 135: 287-316.
- 32.- Zilka, P., From, R. y Riedl, A. (1970). *Experientia* 26: 123-124.
- 33.- Zandberg, E. y Cordeiro, F. (1967). *In Lectures, Biol. Biochem. Clinical Biochem.* (DeG Maess, Ed). Vol. 11. W. de Gruyter Co. Berlin. pp: 721-727.
- 34.- Barreiro, L., Falasca, A., Franceschi, C., Licastro, F., Rossi, C.A. y Stierpe, F. (1983). *Biochem. J.* 215: 433-439.
- 35.- Liu, J.Y. y Chow, T.S. (1964). *J. Biochem.* 94: 35-66.
- 36.- Bayle, G.C. y Connolly, S.L. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 4712-4719.
- 37.- Prosser, G.H. y Cornfield, D. (1975). *J. Biol. Chem.* 250: 6973-6983.
- 38.- Zilka, P. y Zilka, P. (1968). *Experientia* 24: 1280-1284.
- 39.- Bayle, G.C., Fisher, J.A., Simpson, G.A. y Barredas, S.H. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2550-2557.
- 40.- From, S.B., Simpson, G.A., Ross, J.E. y Barredas, S.H. (1974). *Nature* (London) 252: 128, 149-150.
- 41.- Bayle, G.C., Antiserias, H.W. y Barredas, S.H. (1975). *Exp. Cell Res.* 93: 159-166.
- 42.- Shanon, L.H., Ross, S.B. y Barredas, S.H. (1974). *Biochemistry* 13: 3437-3492.
- 43.- Fujita, K., Oishi, K. y Aida, K. (1972). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18: 73-76.
- 44.- Oishi, K., Takahashi, S., Tamiyama, T. y Aida, K. (1979). *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 167-172.
- 45.- Takahashi, S., Oishi, K. y Aida, K. (1979). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25: 397-403.
- 46.- Tamiyama, T., Oishi, K. y Aida, K. (1979). *Biochem. Biophys. Acta* 587: 467-416.
- 47.- Tamiyama, T., Ishizawa, F., Oishi, K. y Aida, K. (1982). *Appl. Microbiol. Chem.* 46: 529-529.
- 48.- Corley, H.O. y Zusan, B.R. (1981). *J. Biol. Chem.* 256: 12561-12566.

Bibliografía

49. Kohler, S. y Nicolson, S. (1968). *Insect. Immunity* 29: 221-225.
50. Iqbal, F.W., Essel, J. y Nishiyasu, S.M. (1963). *Develop. Comp. Immunol.* 7: 449-452.
51. Ferrante, A. y Allison, A.C. (1967). *Parasite Immunol.* 3: 539-546.
52. Wyrick, R.E., Winkler, T. y Merrick, J.L. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2847-2871.
53. Prasad, G., Oshrooback, G. y Andler, H. (1968). *Vox Sang* 14: 321-323.
54. Farooq, G.I. y Whitebrect, G. (1978). *J. Med. Lab. Technol.* 27: 249-243.
55. Oda, Y., Ichijo, S., Niwa, T., Noda, K., Yamamoto, K. y Aoyama, S. (1984). *J. Pharm. Res.* 7: 414-423.
56. Ben, M., Mollath, S.R. y Grossberg, A. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 621-627.
57. Kase, J. y Schwall, G. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 341-343.
58. Meyer, E.C., Ibarra, F.T. y Barandien, S.H. (1979). *J. Cell. Biol.* 57: 545-571.
59. Meyer, E.C. y Barandien, S.H. (1982). *J. Cell. Biol.* 92: 18-27.
60. Sano, T.P., Kohler, S., Suel, L.E. y Barandien, S.H. (1977). *J. Biol. Chem.* 252: 6476-6486.
61. Ben, M. y Mollath, S.R. (1977). *J. Biol. Chem.* 252: 5444-5448.
62. Meyer, E.C., Izumi, G.E. y Barandien, S.H. (1980). *J. Biol. Chem.* 255: 4234-4239.
63. Ishiyama, T., Nakada, H. y Takano, A. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234: 73-94.
64. Pannarström, S., Westin, A. y Björk, I. (1972). *Scand. J. Immunol.* 1: 295-309.
65. Pannarström, S. (1973). *En Methods in Enzymology*. (V. Ginsburg, Ed.) Vol. 28, Part B. Academic Press, pp: 313-318.
66. Pannarström, S. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234: 183-197.
67. Bretting, M., Stenulowski, E., Jacobs, G. y Becker, W. (1983). *Biochem. Biophys. Acta* 749: 143-152.
68. Topp, W.C. (1964). *J. Invertebr. Pathol.* 8: 478-486.
69. Topp, W.C. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234: 19-23.
70. Cohen, E., Rosen, A.H. y Winkler, F.C. (1974). *Life Sci.* 4: 2897-2916.
71. Cohen, E., Rosen, A.H. y Winkler, F.C. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 234: 78-93.
72. Karjalainen, J.J. y Estévez, G.W. (1984). *J. Mol. Biol.* 32: 453-463.
73. Minami, M., Ito, K., Takahashi, H. y Niwa, R. (1977). *Prog. Clin. Biol. Res.* 29: 623-629.
74. Carotach, J.D. y Stewart, J.E. (1975). *J. Invertebr. Pathol.* 7: 255-262.
75. Taita, M. y Cohen, E. (1984). *Experientia* 40: 485-487.
76. Sarafianian, A., Shapiro, O.F. y Sosa, P.M. (1971). *Biochemistry* 10: 3741-3746.
77. Sosa, P.M. y Shapiro, O.F. (1973). *En Methods in Enzymology*. (V. Ginsburg Editor). Vol. 28, Part B. Academic Press, pp: 389-398.
78. Taita, M., Uchi, S., Sillan, J., Bellack, B. y Roschell, B. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1983-1987.
79. Suda, H., Prizer, M.E., J. Roschell, B., Stuckert, H.A. y Merrill, A.C. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 3534-3543.
80. Suda, H., Nicolson, S. y Barandien, S.H. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 7581-7587.
81. Gubins, R.J., Engelhardt, H. y Gorman, F. (1984). *Immunology* 57: 581-587.
82. Gartner, L.D. y Podlaski, T.B. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 1182-1189.
83. Malakhov, N., Tronson, A.H. y Novaya, N.V. (1980). *Fertil. Steril.* 34: 979-993.
84. Cerra, R.F., Raymond-Helf, P.L. y Novaya, N.V. (1984). *J. Cell. Biol.* 78: 1568-1569.
85. Anhalt, B. y Harford, J. (1982). *Ann. Rev. Biochem.* 51: 331-354.
86. Powell, J.T. (1983). *Biochem. J.* 107: 123-129.
87. Kellum, E.D., Wojcay, W., Fletcher, P. y Korobá, S. (1979). *J. Cell. Biol.* 51: 528-537.
88. Saldana, S. y Sosa, P. (1979). *Jpn. J. Exp. Med.* 49: 397-404.
89. Taita, M., Green, L.L.W., Kachana, H.L., Levin, H.I. y Warner, B.F. (1982). *Nature* 295: 246-248.
90. Kline, R.L.T., Suel, D.J., Davis, R.J. y Sharon, M. (1978). *FEBS Lett.* 94: 391-394.
91. Stahl, P.S., Lerman, J.S., Miller, H.I. y Schliesser, P.H. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1479-1483.
92. Goto-Sakuma, Y., Schliesser-Pfeifer, J., Vogel, J. y Eib, H. (1982). *Cell* 29: 651-663.
93. Goyard, M.H.L. y Melotz, L.T. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 147: 742-771.
94. Sosa, P.M. y Lauer, L.E. (1967). *Biochemistry* 4: 185-191.
95. Nicolson, S.L. y Blumstein, J. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 264: 943-947.
96. Taita, M., Karpman, T., Ouzaki, K., Ichio, G., Sosa, P. y Uchi, T. (1972). *Experientia* 28: 84-85.
97. Krasna, M., Suda, H. y Parodi, J. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 318: 444-452.
98. Cantor, C.R. (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 2889-2895.
99. La Vigne, S., Kaplan, R.J. y Brodeur, P.J. (1972). *Biochem. J.* 129: 847-854.
100. Tomiyama, H. y Iida, H. y Shimamura, W.R. (1964). *J. Gen. Chem. Soc.* 70: 764-767.
101. Kaplan, H. y Iida, H. (1964). *J. Exp. Med.* 123: 1861-1861.
102. Eitler, R.E. Kabat, E. (1970). *Biochemistry* 9: 869-877.
103. Eitler, R.E. (1973). *En Methods in Enzymology*. (V. Ginsburg, Ed.) Vol. 28, Part B. Academic Press, N.Y. pp: 288-294.
104. Brown, J.L. y Kristiansen, T. (1978). *FEBS Lett.* 98: 145-148.
105. Kato, A. y Luedig, G. (1964). *Biochim. Biophys. Acta* 14: 364-367.
106. Sosa, P., Iwashita, G. y Ishii, S.T. (1971). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 45: 1271-1278.
107. Kachana, H.H., Sayer, W.H. y Nichol, L.W. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 242: 293-293.
108. Saldana, S.L. y Goldstein, J.J. (1968). *Can. J. Biochem.* 46: 1143-1150.
109. Uchi, S. y Nakamoto, T. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 29: 238-239.
110. Saldana, S.L. y Goldstein, J.J. (1968). *Arch. Biochem. Biophys.* 124: 218-219.
111. Uchi, S. y Goldstein, J.J. (1968). *FEBS Lett.* 9: 377-381.
112. Varti, J., Varti, A.J. y Lovitt, G. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 155: 363-318.
113. Pannarström, S., Eilicher, B., Titch, H., Kozlik, J.V. y Kaczmarek, J. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 237: 513-518.
114. Pannarström, S., Titch, H., Eilicher, G., Kozlik, J.V. y Kaczmarek, J. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 237: 388-393.
115. Carter, W.D. y Eitler, R.E. (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 2736-2742.
116. Titch, H., Eilicher, W., Kozlik, J.V. y Kaczmarek, J. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 221: 282-289.
117. Suda, H., Sosa, P.M., Stein, M.M., Young, W.H., Luan, M.A. y Bickel, R.F. (1971). *J. Biol. Chem.* 246: 1598-1599.
118. Suda, H. y Scheinberg, S.A. (1978). *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 1-11.
119. Taita, M. y Sosa, P. (1972). *Immunology* 22: 871-883.

Bibliografía

120. Miller, J.D., Boyer, C., Holariukson, R., Kingdon, H. y Yachnis, S. (1973). *J. Exp. Med.* 138: 939-951.
121. Pavlati, S. y Salt, W.B. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 365: 57-71.
122. Liu, H., Friedman, C., Sharon, N. y Kitchalski, E. (1964). *Arch. Biochem. Biophys.* 117: 361-369.
123. Calzadilla, H. y Meyer, E.B. (1969). *Arch. Biochem. Biophys.* 132: 279-283.
124. Rice, S.H. y Etlinger, R.E. (1973). *Biochemistry* 12: 4093-4099.
125. Casper, B.H. y Baranow, S.H. (1961). *J. Biol. Chem.* 236: 5044-5051.
126. Stamburjyer, P.W., Wilfing, K.B. y Goldstein, I.J. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* 177: 330-336.
127. Matsumoto, I. y Osawa, T. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 194: 180-189.
128. Matsumoto, I. y Osawa, T. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* 140: 404-411.
129. Radiger, H. (1977). *Eur. J. Biochem.* 72: 317-322.
130. Neuvirth, K.J., Young, K.H. y Moratch, H.W. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 9205-9210.
131. Nagberg, R., Holmes, H. y Porath, J. (1968). *Biochim. Biophys. Acta* 166: 116-117.
132. Barnack, C.M., Radiger, H. y Strochero, J.D. (1971). *FEBS Lett.* 102: 214-218.
133. Kaloupek, F.H. y Porath, J.D. (1971). *Biochemistry* 10: 4006-4012.
134. Casan, G., Haratz, A., Naier, H., Sároshy, B. y Porath, J.D. (1977). *Biochemistry* 16: 1444-1450.
135. Toyoshima, S., Akiyama, Y., Okano, G., Tamamura, A. y Osawa, T. (1971). *Biochemistry* 10: 4437-4443.
136. Okano, T. (1979). *Folia. de Biol.* 27: 103-113.
137. Allen, S.W., Rubenow, A. y Sharon, N. (1973). *Biochem. J.* 131: 155-162.
138. Nagata, Y. y Burger, W.H. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 3116-3122.
139. Matfeld, W.A., Burrows, J., Chesno, L.M. y Small, P.A.Jr. (1967). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30: 2920-2927.
140. Gardal, H.J. (1974). *Biochemistry* 13: 3671-3673.
141. Gelbrich, G. y Goldstein, I.J. (1972). *Biochemistry* 11: 3976-3980.
142. Sacke, S.C. y Messinger, H. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 371: 232-234.
143. Rice, S.H. y Etlinger, R.E. (1971). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39: 416-419.
144. Lotan, R., Liu, H. y Sharon, N. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62: 144-150.
145. Carlson, M.G. y Etlinger, R.E. (1975). *Biochemistry* 14: 2383-2389.
146. Filigorena, G., Saloveva, A., Yicha, H. y Kacovsch, J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 351: 416-426.
147. Privat, J.P., Belmonte, F. y Messinger, H. (1974). *FEBS Lett.* 44: 229-230.
148. Privat, J.P., Belmonte, F. y Messinger, H. (1974). *FEBS Lett.* 44: 229-232.
149. Lotan, R., Slegman, H.U., Liu, H. y Sharon, N. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 1219-1224.
150. Troubridge, I.D. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 6094-6097.
151. Porath, H.E.S., Vabat, E.S. y Sharon, N. (1970). *Carbohydr. Res.* 37: 89-102.
152. Lotan, R., Stulevsky, E., Sassen, D. y Sharon, N. (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 0510-0523.
153. Porath, H.E.S., Kabat, E.A., Lotan, R. y Sharon, N. (1974). *Carbohydr. Res.* 31: 107-110.
154. Toyoshima, S., Yabuta, H. y Osawa, T. (1972). *Biochemistry* 11: 6000-6003.
155. Young, K.H. y Loom, S.A. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 365: 410-420.
156. Etlinger, R.E. (1974). *J. Biol. Chem.* 249: 4364-4367.
157. Robinson, P. Bull. F.O. Anderson, S.H. y Smith, J.W. (1973). *FEBS Lett.* 50: 320-333.
158. Kals, S.J. y Lavitza, A. (1968). *Biochem. J.* 109: 667-672.
159. Kristian, H. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 229: 275-284.
160. Alford, S.H. (1970). *J. Immunol.* 104: 676-703.
161. Washlin, J. y Root, G.P. (1972). *Ontario Res Biol.* 242: 20-30.
162. Raboin, S.H. y Orndorf, E.L. (1974). *Science* 183: 269-271.
163. Narayanaswami, V.V. y Kamer, U.S. (1970). *Plant Physiol.* 62: 71-74.
164. Jazza, F.V., Meehl, C.S. y Hobbell, R.A. (1974). *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 160-171.
165. Tolbot, C.F. y Etlinger, R.E. (1970). *Plant Physiol.* 61: 847-850.
166. Etlinger, R.E. y Tolbot, C.F. (1970). *Biochemistry* 9: 1474-1478.
167. Gibson, D. y Scales, S. (1973). *Plant Physiol.* 63: 136 (abst).
168. Gibson, D. (1970). *Ann. Rev. Phytopathol.* 16: 453-461.
169. Sogawa, S. (1970). *Ann. Rev. Phytopathol.* 16: 453-461.
170. Ponce, S.A., Kuffa, J.A., Siegan, P. y Barondes, S.H. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2594-2557.
171. Frazier, W.A., Brown, S.M., Millerberg, R.V. y Barondes, S.H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 7714-7721.
172. Chang, C.H., Brown, S.M. y Barondes, S.H. (1977). *Exp. Cell Res.* 104: 181-189.
173. Fimland, C.L., Sand, R.A. y Litman, G.O. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 291: 170-180.
174. Ashwell, G. y Morell, A.S. (1974). *Adv. Enzymol.* 41: 99-120.
175. Kammsell, T. y Ashwell, G. (1975). *J. Biol. Chem.* 250: 1296-1302.
176. Stecker, R.J., Morell, A.S. y Scheinberg, J.M. (1974). *Science* 184: 245-246.
177. Wengrovsky, M. y Ashwell, G. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 676-678.
178. Stockert, R.J., Morell, A.S. y Morell, A.S. y Morell, A.S. (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 3030-3031.
179. Sand, R.A., Brown, S.M. y Barondes, S.H. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48: 650-657.
180. Pan, H., Holton, B.A., Muenzberg, A. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 621-627.
181. Paulson, Y.H. y Greenberg, J. (1968). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1054-1058.
182. Carlson, T.W. y Podleski, F.H. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 972-978.
183. Barondes, S.H. (1971). *Ann. Rev. Biochem.* 30: 207-231.
184. Eshdat, Y., Ofek, I., Yastov-Gay, Y., Sharon, N. y Niroulan, B. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35: 1331-1339.
185. Jones, G.W. y Frater, G. (1976). *Insect. Immunol.* 14: 240-245.
186. Ofek, I., Niroulan, B. y Sharon, N. (1977). *Nature* 265: 623-625.
187. Fretcher, C., Wuchler, H., Levy, H., Palozzo, A. y Jaife, V. (1969). *Phytochemistry* 8: 1739-1743.
188. Riggs, B.A. y Dawson, E.E. (1973). *J. Biol. Chem.* 248: 607-615.
189. Riggs, B.A. y Johnson, E.E. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 241: 800-810.
190. Wilson, L.S., Swenson, P.W. y Yachnis, S. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 334-301.
191. Foisel, R., Lavitza, A. y Kacovsch, J. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 305: 72-81.
192. Sela, S.A., Liu, H., Sharon, N. y Sachs, I. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* 310: 273-277.

Bibliografía

193. Leavitt, R., Feistel, R. y Bachor, W. (1977). *J. Biol. Chem.* 252: 2941-2966.
194. Allan, B. y Frangou, E.J. (1971). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 44: 1143-1149.
195. Ch. Y.H. y Conrad, R.A. (1972). *Arch. Biochem. Biophys.* 152: 631-637.
196. Weber, T.H., Ara, H. y Morahan, C.T. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 263: 94-105.
197. Tachino, S. y Swenson, R. (1972). *Immunol.* 22: 871-882.
198. Tachino, S., Arita, I.W., Ara, J.W. y Swenson, R. (1972). *Cell. Immunol.* 3: 569-589.
199. Miller, J.D., Hua, R., Melnick, R. y Tachino, S. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 1308-1311.
200. Weber, T. y Grashof, R. (1968). *Scand. J. Clin. Invest.* 21, suppl. 101: 16.
201. Weber, T.H. (1967). *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 20, suppl. 111: 1-89.
202. Takahashi, T., Kamachidomariyoshi, P. y Linsen, J.F. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 133: 123-133.
203. Schlygum, A., Pusch, J. y Lindahl-Klingberg, L. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* 137: 386-319.
204. Pöhlman, S. y Sjöblom, K. (1970). *Eur. J. Biochem.* 17: 23-26.
205. Anderson, A.T. (1974). *Biochem. J.* 139: 421-429.
206. Jaffe, G.G. y Manning, K. (1951). *Arch. Biochem. Biophys.* 109: 68-91.
207. Pataki, A., Deaf, G. y Stewart, J.C. (1961). *Biochim. Biophys. Acta* 471: 146-154.
208. Ohlavi, A., Sebaste, S. y Nisali, B. (1960). *J. Biochem.* 87: 487-416.
209. Murolo, R. y Perrone, J.C. (1977). *Plant Physiol.* 59: 763-767.
210. Hialonier, G., Privat, J.P., Hunsinger, H., Kahlow, G. y Durand, R. (1973). *Physiol. Veg.* 11: 519-527.
211. Boudreau, M. y Kacourou, J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 297: 328-332.
212. Kabanov, S., Kalbacher, B. y Kacourou, J. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* 204: 93-107.
213. Cohen, J.L. y Kristiansen, T. (1962). *Biochim. Biophys. Acta* 705: 294-304.
214. Golik, H.R. y Scheinberg, S.I. (1970). *Arch. Biochem. Biophys.* 141: 467-513.
215. Gilbreath, W. y Golstein, I.J. (1973). En *Methods in Enzymology* (W. Griegler Ed.). Vol. 20, part B. Academic Press. pp: 310-322.
216. Bessler, W. y Golstein, I.J. (1972). *FEMS Lett.* 26: 50-62.
217. Maddipati, K.R., Weisenthal, L.M., Ludlow, B.E., Bessler, W. y Golstein, I.J. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 1090-1091.
218. Calderon, R.A. y Córdoba, F. (1969). *FEMS Lett.* 102: 100-102.
219. Calderon, R.A. y Córdoba, F. (1974). *Eur. J. Immunol.* 4: 322-325.
220. Herrera, E.M., Nostelo, G., Córdoba, F. (1962). *Lectins. Biology, Biochem. Clin. Biochem. Vol. II.* (Ch. Nansen, Ed.) Walter de Gruyter Co. N.Y. pp: 492-700.
221. Cohen, J.L., Kristiansen, T., Haerter, W.J. y Rodríguez, J. (1971). En *Protides of Biological Fluid* 27th. Collingium. (Pontere, N. Ed.). Pergamon Press, Oxford. pp: 381-386.
222. Cohen, J.L., Kristiansen, T. y Pataki, S. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 577: 182-199.
223. Cohen, J.L., Sierra, A. y Córdoba, F. (1961). *Lectins. Biology, Biochem. Clin. Biochem. Vol. I.* (Ch. Nansen, Ed.) Walter de Gruyter Co. N.Y. pp: 73-88.
224. Anonimo. D. Comunicación personal.
225. Levy, S.W., Schneider, B.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 245-275.
226. Himmelspach, J. y Kunitz, S. (1960). *Anal. Biochem.* 25: 367-352.
227. Weber, R. y Hubers, H. (1969). *J. Biol. Chem.* 244: 4088-4111.
228. Struchiner, S.M., Gray, W.W. y Moore, S. (1960). *Anal. Chem.* 30: 1190-1204.
229. Deane, G.L. y Scheid, E. (1957). *Anal. Chem.* 29: 1192-1194.
230. Hahnle, M., Wilson, R.A., Hamilton, J.K., Hubers, P.A. y Smith, F. (1956). *Anal. Chem.* 28: 250-254.
231. Kottmann, H.J., Sponil, H., Bach, C.H. y Bach, P.A. (1971). *Transplantation* 11: 240-271.
232. Sjöblom, P. y Nannberg, C. (1970). *Eur. J. Biochem.* 63: 163-168.
233. Itoh, K., Koeda, H., Kamada, H., Iizuka, K., Ohimochiyoshi, T. y Takahashi, T. (1966). *Agric. Biol. Chem.* 44: 125-129.
234. Mercuriano, H., Anderson, F.J. (1962). *Cancer Res.* 22: 525-540.
235. Sifton, D.H. y Rubin, H. (1970). *Oncology* 277: 043-043.
236. Sauerbrey, V., Weber, T.H. y Uppeloch, P. (1972). *Eur. J. Biochem.* 26: 193-200.
237. Bernick, J.T., Bull, C. y Gray, W.W. (1974). *Scand. J. Immunol.* 5: 771-778.
238. Inoh, K., Sun-Bussat, M. y Sachs, L. (1973). *Exp. Cell Res.* 74: 149-151.
239. Yonita, M., Marukawa, T., Masuda, Y., Otama, T., Satural, T. y Urita, T. (1962). *Int. J. Cancer* 19: 662-664.
240. Holmstedt, I. y Osawa, T. (1972). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 44: 1010-1015.
241. Cohen, J. (1961). *J. Chemol.* 210: 351-360.
242. Schmidt-Gillich, K., Gullack, B.W. y Wiedrichs, J. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 442: 587-600.
243. Reed, B.D., Sams, R.A., Wisnault, W. y van Soest, L.L.R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* 470: 325-330.
244. Phillips, P.G. y Cahin, H. (1977). *Exp. Cell Res.* 104: 31-34.
245. Balci, D.W., Spector, S.F., Richards, R.L. y Alving, C.R. (1977). *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 74: 200-214.
246. Van Der Bosch, J. y Mac Connell, H.M. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 4089-4113.
247. Yarnfield, E. y Yarnfield, S. (1970). *J. Biol. Chem.* 245: 2534-2543.
248. Struchiner, J.A., Sildon, C.P. y Silber, R. (1970). *J. Immunol.* 104: 746-760.
249. Takahashi, T., Kamachidomariyoshi, T., Imada, H., Krotum, K. y Linsen, J.F. (1971). *Exp. Biol. Chem.* 35: 1274-1281.
250. Gordon, J.R. y Margardt, R.B. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* 320: 134-144.
251. Welford, J., Inoh, K. y Sachs, L. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* 274: 304-309.
252. Holmstedt, U., Hammarström, S., Billar, H.L., Perlman, H. y Perlman, P. (1974). *Scand. J. Immunol.* 5 suppl.: 65-69.
253. Holmstedt, U., Hammarström, S., Billar, H.L. y Perlman, P. (1974). *J. Exp. Med.* 144: 1381-1390.
254. Balci, D.W. y Lyons, R.D. (1977). *Cell. Immunol.* 42: 82-93.
255. Balci, D.W. y Lyons, R.D. (1979). *J. Immunol.* 123: 699-816.
256. Sharon, R. (1963). *Adv. Immunol.* 34: 213-290.
257. Reed, B.D., Sawyer, W.W., Acton, R.T. y Bach, C.H. (1960). *J. Exp. Med.* 151: 600-604.
258. Reed, B.D., Sawyer, S., Almond, S. y Phillips, E. (1961). *J. Immunol.* 127: 2530-2500.
259. Schwartz, H.J., Lutz, H.A. y Peifer, H.P. (1970). *J. Immunol.* 104: 245-248.

Bibliografía

240. Pich, E., Demissé, J., Krejčí, J. y Jark, J.C. (1978). *Cell. Immunol.* 11: 92-102.
241. Sanderson, C.C., Ames, A.A. y Seil, R.W. (1974). *J. Immunol. Methods* 3: 55-63.
242. Lowndes, E.J. y Metcalf, W.B. (1974). *Crit. Immunol.* 24: 200-210.
243. Scherer, S.J. y Harris, J. (1974). *J. Immunol.* 114: 140-143.
244. Lucas, S.D. y Himmelfarb, G. (1977). *In Regulatory Mechanisms in Lymphocyte Activation* (S.G. Lucas, Ed.). Academic Press, N.Y. pp: 74-99.
245. Jacobs, S.V. y Forst, S.D. (1966). *Cell. Immunol.* 5: 416-429.
246. Miller, R.A. (1963). *J. Immunol.* 131: 264-267.
247. Ito, T., Tsurumaru, M., Tanaka, A. e Nishiyama, H. (1964). *J. Immunol.* 132: 2440-2444.
248. Nishi, S.S. y Farber, J.J. (1971). *Cell. Immunol.* 40: 432-436.
249. Matsuo, J. y Kikuchi, S. (1968). *Transplant. Rev.* 5: 257-276.
250. Van Rans, J., De Ley, M., Claeyss, W., Gilliams, A., Vermylen, C. y De Weert, P. (1961). *Eur. J. Immunol.* 1: 371-382.
251. Felix, H. y Donatucci, W. (1972). *Adv. Immunol.* 15: 1-94.
252. Miller, R.W. (1973). *Transplant. Rev.* 2: 97-99.
253. Phillips, G. y Hall, G. (1972). *Nature New Biol.* 241: 254-256.
254. Phillips, G. y Holmboe, E. (1974). *Clin. Exp. Immunol.* 24: 283-297.
255. Chens, L., Buchsbaum, B.V. y Schionano, S.S. (1974). *J. Immunol.* 113: 1112-1117.
256. Epstein, L.D., Kruth, R.W. y Rosenbaum, L.A. (1974). *Cell. Immunol.* 12: 407-421.
257. Ochs, R.S. y Serice, F. (1974). *Eur. J. Immunol.* 4: 193-199.
258. Bravaco, M., Janassy, G. y Duvachoff, R. (1974). *J. Exp. Med.* 140: 1-10.
259. Luberman, S.P., Switzer, L. y Gray, R.S.Jr. (1974). *J. Exp. Med.* 139: 1551-1547.
260. Hershman, H. (1973). *Clin. Exp. Immunol.* 19: 75-81.
261. Bergmann, S., Buchsbaum, J., Borsell, F. y Garavito, A. (1974). *J. Immunol.* 114: 437-443.
262. Inoué, M., Sano, S. y Inoue, E., Harada, N.S. y Pratch-Hillis, T. (1974). *Clin. Exp. Immunol.* 24: 180-187.
263. Bergman, S. y Serice, F. (1973). *Immunology* 21: 273-281.
264. Hsu, Y. y Hsu, H. (1973). *Immunology* 24: 425-439.
265. Kieffer, R.S., Cooper, W.B. y Lian, H.S. (1974). *J. Immunol.* 117: 1530-1544.
266. Sigal, F. y Sigal, H. (1977). *J. Immunol.* 118: 642-651.
267. Anderson, J., Sjöberg, S. y Miller, S. (1972). *Transplant. Rev.* 11: 121-177.
268. Anderson, J., Miller, S. y Sjöberg, S. (1972). *Surv. J. Immunol.* 2: 22-100.
269. Hitchcock, H.A. (1971). *Immunology* 14: 52-61.
270. Miller, S. (1970). *Cell. Immunol.* 1: 373-380.
271. Taylor, W. y Iverson, S.H. (1971). *Proc. Roy. Soc. B* 174: 393-399.
272. Anderson, J., Esheloni, S.H., Miller, S. y Vignard, D. (1973). *Eur. J. Immunol.* 2: 232-243.
273. Grosser, M., Demissé, J. (1972). *Nature New Biol.* 235: 45-48.
274. Smith, J.H. (1973). *Lab. Inv. Biophys.* 31: 43-47.
275. D'Alon, S.L., Farber, J.J. y Sims, J.F.P. (1970). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 67: 291-295.
276. Fisher, S.J. y Miller, S. (1968). *Biochemistry* 7: 136-140.
277. Fisher, S.J. y Miller, S.C. (1971). *Biochim. Biophys. Acta* 244: 430-440.
278. Fisher, S.J. y Miller, S.C. (1969). *Biochim. Biophys. Acta* 174: 214-223.
279. Kay, J.E. (1968). *Nature* 219: 171-173.
280. Bruch, W. y Farber, E. (1972). *Eur. J. Biochem.* 27: 133-141.
281. Nathaniel, D. y Hatters, A. (1963). *Nat. Immunol.* 28: 1259-1265.
282. Smith, J.H., Steiner, S.L. y Farber, C.W. (1971). *J. Clin. Invest.* 50: 642-648.
283. Lytle, L.H. y Farber, C.W. (1974). *Biochemistry* 13: 5415-5420.
284. Grosser, M., Farber, C.W. y Farber, C.W. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 1029 (abst).
285. Dutton, R.H., Day, C.V. y Moore, C. (1974). *Life Sciences* 15: 1277-1281.
286. Larsson, E.L., Lindqvist, H.W. y Carlsson, E. (1968). *Nature* 220: 454-457.
287. Anderson, J., Grosser, M., Larsson, E.L. y Carlsson, E. (1971). *Eur. J. Immunol.* 1: 501-506.
288. Anderson, E.E., Brown, W.P. y Anderson, E.L. (1963). *Eur. J. Immunol.* 13: 457-461.
289. Larsson, E.L. y Carlsson, E. (1971). *Nature* 230: 299-297.
290. Anderson, E.E., Brown, W.P. y Gordon, L.S. (1965). *Can. J. Immunol.* 13: 452-454.
291. Harris, J. (1963). *Eur. J. Immunol.* 13: 594-604.
292. Hsu, Y. y Hall, W.C. (1977). *Eur. J. Immunol.* 7: 423-428.
293. Grosser, M., Sachs, H.W. y Hader, R.L. (1974). *J. Immunol.* 131: 1911-1917.
294. Fisher, S.J., Ginzburg, R., Wickett, E., Jellano, C.G. y Moore, M. (1973). *Transplantation* 11: 831-833.
295. Fisher, S.J. y Paul, E.E. (1972). *Transplant. Rev.* 11: 64-80.
296. Fisher, S.J. y Paul, E.E. (1972). *J. Immunol.* 118: 342-375.
297. Hsu, S.H., Shiner, A.W. y Kerkhof, S. (1972). *J. Clin. Invest.* 51: 2223-2230.
298. Carter, H. y Boyse, E.A. (1971). *J. Exp. Med.* 134: 1374-1389.
299. Feldman, H., Beverley, P.C.L., Ducker, M. y Hamilton, G. (1973). *Nature* 250: 414-416.
300. Miller, H., Rajshim, P., Bean, R.D., Tamachi, T., Boyse, E.A., Oettinger, M.F. y Gie, L.J. (1973). *J. Exp. Med.* 131: 227-241.
301. Top, M. y Bolton, R.W. (1974). *J. Exp. Med.* 143: 1199-1210.
302. Schionano, S., Israel, E. y Serice, F. (1974). *Immunology* 26: 645-672.
303. Rich, S.H. y Pierce, C.W. (1973). *J. Exp. Med.* 137: 265-273.
304. Rich, S.H. y Pierce, C.W. (1973). *J. Exp. Med.* 137: 449-459.
305. Schimpl, A. y Wüthrich, E. (1972). *Nature New Biol.* 231: 15-17.
306. Grosser, M., Esheloni, R., Weisling, J. y Hsu, P. (1973). *J. Immunol.* 118: 43-52.
307. Grosser, M., y Kala, S. (1974). *J. Exp. Med.* 140: 17-27.
308. Pich, E., Krejčí, J. y Jark, J.C. (1978). *Nature* 275: 224-230.
309. Hall, S.F. y Sigal, G. (1973). *Cell. Immunol.* 9: 74-105.
310. Egan, R.S., Broger, M.J. y Esheloni, S.H. (1974). *J. Immunol.* 112: 43-49.

Bibliografía

331. - Kanno, Y. y Katz, E.N. (1973). *J. Immunol.* 111: 1524-1543.
 332. - Ruddle, C.G. y Weigle, W.D. (1975). *J. Immunol.* 115: 556-568.
 333. - Egan, H.S. y Eshkol, D.D. (1975). *Cell. Immunol.* 18: 365-374.
 334. - Levy, H.A. y Schwartz, H.J. (1969). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131: 725-734.
 335. - Marhamitz, W., Perona, D.R., Sitnick, D.L. y Witt, R.E. (1969). *Science* 163: 476.
 336. - Birnbl, A., Severio, E. y Toub, S.D. (1973). *Transplantation* 16: 91-95.
 337. - Gershin, H.E. y Steinberg, A.D. (1973). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 40: 220-224.
 338. - Lase, F.C., Pettit, J.C., Gordon, E. y Wessno, E.H. (1973). *Clin. Immunol. Immunopathol.* 2: 74-82.
 339. - Calne, R.Y., Wheeler, J.R. y Hara, D.A.L. (1965). *Brit. Med. J.* 2: 154-161.
 340. - Markley, K., Evans, G. y Swillman, E. (1967). *Transplantation* 5: 153-154.
 341. - Markley, K., Thornton, S., Swillman, E., y Markley, P. (1969). *Transplantation* 8: 230-244.
 342. - Sartor, H.S., Marras, J.S., Sample, W.F. y Christie, P.S. (1969). *Fed. Proc.* 28: 582 (abst).
 343. - Stefani, S.G. y Moore, C.W. (1970). *J. Immunol.* 104: 780-794.
 344. - Sun, K., Winckler, W., Kashimagi, S., MacCumber, W.H.R., Climas, H.W. y Starzl, R.E. (1970). *Surgery* 67: 322-327.
 345. - Stevens, J.E. y Williamsby, D.R. (1967). *Nature* 215: 947-948.
 346. - Marcus, E., Nison, D.R. y Siegel, S.V. (1968). *Experientia* 24: 834-837.
 347. - Markov, H.L., Millan, W.D. y Lessor, E.W. (1969). *Transplantation* 8: 413-421.
 348. - Simons, S.H., Wimpf, G.K. y Richter, W. (1967). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 31: 398-399.
 349. - Fick, E. y Foljman, J.B. (1968). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 127: 524-526.
 350. - Petronyi, B., Janosy, G. y Alföldi, P. (1969). *Nature* 221: 76-78.
 351. - Camins, C.D. y Busch, H.C. (1974). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 47: 448-458.
 352. - Edelman, P.S. y Cobb, Z.A. (1974). *J. Exp. Med.* 140: 1334-1364.
 353. - Williams, B. y Kay, A. (1973). *Exp. Cell Res.* 74: 393-400.
 354. - Grestean-Salorsky, A. y Fick, E. (1979). *Cell. Immunol.* 45: 415-427.