



2/2
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ACTIVIDAD BIOLOGICA DE EXTRACTOS CRUDOS
DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS SILVESTRES Y
COMESTIBLES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A ;

MARIA GUADALUPE AGRAZ BALCAZAR

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAG.
CAPITULO I :	
INTRODUCCION	1
OBJETIVO	2
CAPITULO II,:	
GENERALIDADES	3
CAPITULO III :	
MATERIAL Y METODOS	31
RESULTADOS Y DISCUSION	41
CAPITULO IV :	
CONCLUSIONES	70
CAPITULO V :	
BIBLIOGRAFIA	71

CAPITULO I

INTRODUCCION:

Las lectinas son glicoproteínas encontradas principalmente en las leguminosas, las cuales tienen gran cantidad de propiedades biológicas. Poseen la capacidad de unirse a los azúcares de las superficies celulares, pudiendo así detectar células que presentan una transformación maligna. También se emplean para evaluar la inmunidad celular *in vitro* mediante la estimulación de los linfocitos.

Las lectinas tienen un papel importante en el análisis cromosómico, funcionando como mitógenos.

Aparte de aglutinar glóbulos rojos, también lo hacen con espermatozoides, bacterias y hongos.

Una de las fuentes más abundantes de lectinas son las leguminosas, como se mencionó anteriormente. En este trabajo se obtuvo el extracto crudo de nueve leguminosas seleccionadas y posteriormente se llevaron a cabo las siguientes determinaciones: contenido de proteínas, hemaglutinación, actividad mitogénica y citotoxicidad.

Competir tecnológicamente con los países avanzados en procesos de aislamiento y purificación de lectinas es difícil, pero si podemos aprovechar los recursos naturales de nuestro país, produciendo a bajo costo lectinas que satisfagan la demanda del mercado nacional, evitando así la importación.

OBJETIVO:

-Determinar la actividad hemaglutinante, mitogénica y la citotoxicidad de los extractos crudos de nueve semillas de leguminosas silvestres y comestibles.

-Averiguar si existe correlación entre los factores antifisiológicos estudiados.

CAPITULO II

GENERALIDADES:

El estudio de las lectinas se remonta al año de 1888, en el que Stillmark, descubrió que el extracto de las semillas de *Ricinus communis* aglutinaban los eritrocitos de algunos animales. A raíz de sus investigaciones dedujo que una proteína era la responsable de la aglutinación, a la que llamó ricina. Kobert en 1906 observó este mismo efecto en el extracto de otras dos plantas: obrina en *Abrus precatorius* y crotina en *Croton tiglium*.(17)

Ehrlich en 1891 detectó que los extractos de algunas plantas eran buenos inmunógenos. Landsteiner, por el año de 1908, logró desechar la idea de que cuando un extracto es hemaglutinante necesariamente debe ser tóxico o que la capacidad de aglutinación está en relación con su toxicidad.(45)

Harris en 1915, encontró que las preparaciones de semillas de *Glycine max*, aglutinaban los eritrocitos fuertemente. La proteína activa fué aislada más tarde por Liener y Pallansch en 1952.(17)

La concanavalina A obtenida de la *Canavalia ensiformis* fue la primera lectina que se purificó y James B. Sumner hacia el año de 1919 la cristalizó. Esta lectina al adicionarse a una solución de glucógeno, provocaba la precipitación de éste. La propiedad anterior fué observada en 1936 por Sumner y Howell.

Concluyeron que era debido a la reacción de las proteínas con los carbohidratos presentados en la superficie de los eritrocitos. Más tarde esto fué comprobado por Winifred Watkins y Walter, hacia 1952, quienes confirmaron que al adicionar algunos azúcares sencillos no se lograba la aglutinación porque los azúcares la impedían ocupando los sitios de unión.

El rápido desarrollo en la preparación y uso de antígenos bacterianos hizo que las fitohemaglutininas se olvidaran como reactivos auxiliares en Inmunología. En 1948 RenKonen revivió este interés, reportando que los extractos de diversas especies de leguminosas presentaban parcial especificidad por los antígenos A B y O humanos. Él demostró que 6 de las 99 especies probadas fueron claramente selectivas para ciertos grupos sanguíneos. El género *Phaseolus* es considerado como una fuente importante de fitohemaglutininas particularmente las semillas de *P. vulgaris* y *P. coccineus*.(17)

El término lectina fué introducido por Boyd (del Latín *legere* que significa escoger). La interpretación de este concepto no es uniforme, debido a que no se conocen todas las funciones fisiológicas de las lectinas.

En todas las concepciones de las lectinas se coincide en dos puntos:

- a) Las lectinas son carbohidratos unidos a proteínas y
- b) No son de origen inmune.(13)

Las lectinas se encuentran en plantas y principalmente en las leguminosas. La presencia de las lectinas en semillas ha sido estudiada ampliamente, pero también hay evidencias basadas en la hemaglutinación y radioinmunoensayo, las cuales afirman la existencia de lectinas en tallos, hojas y raíces. Respecto a estas últimas, algunos autores postulan la hipótesis de que la simbiosis del género *Rhizobium* con las raíces de las plantas leguminosas es debido a una lectina, ya que las células rizobiales tienen carbohidratos de superficie semejantes a polisacáridos capsulares, las cuales se unen a las moléculas complementarias encontradas en las raíces "las lectinas". Las lectinas en raíces han sido reportadas en frijol y chicharo.(38)

Las lectinas también se pueden obtener de invertebrados marítimos, como son las lectinas extraídas de la almeja *Megapitaria squafida* y la del caracol terrestre, *Melix aspersa*.(1,15) Así como se encontró en estos moluscos la presencia de lectinas, se sigue buscando en nuevas fuentes.(19,46)

La forma comúnmente usada para detectar la presencia de una lectina, se llevó a cabo realizando la prueba de aglutinación celular. Poniendo en contacto una suspensión de eritrocitos lavados en solución salina y la solución que contenga a la lectina. Así la reacción negativa será la sedimentación de los eritrocitos y la reacción positiva será la formación de agregados. Los eritrocitos tienen en su superficie al receptor el cual se ligará con la lectina.

Con distintos tipos de glóbulos rojos, o soluciones de carbohidratos, es posible definir la especificidad serológica y química de la lectinas. Se han logrado detectar lectinas con especificidad hacia los grupos sanguíneos A y O, pero ha sido difícil encontrar una lectina con actividad específica hacia el grupo sanguíneo B. Se ha reportado que el extracto de la semilla *Bandereia simplicifolia* presenta simultaneamente afinidad por los grupos sanguíneos A y B, aunque aglutina con mayor potencia esta última.

En esta tabla se presenta diferentes fuentes de lectina con especificidad serológica. (45)

Fuente	Especificidad serológica
<i>Phaseolus limensis</i>	A
<i>Phaseolus lunatus</i>	A
<i>Vicia peregrina</i>	A
<i>Vicia cracca</i>	A
<i>Vicia villosa</i>	A
<i>Delichos biflorus</i>	A ₁
<i>Crotolaria falcata</i>	A
<i>Crotolaria aegyptiaca</i>	A
<i>Lathyrus sylvestris</i>	A
<i>Myrtis suaveolens</i>	A
<i>Clytocipe nebularis</i>	A
<i>Sophora japonica</i>	A+B
<i>Coronilla varia</i>	A+B
<i>Calpurina aurea</i>	A+B
<i>Crotolaria ussarensis</i>	A+B
<i>Crotolaria striata</i>	A+B
<i>Bandereia simplicifolia</i>	A+B
<i>Caraqna frutex</i> var <i>latifolia</i>	B
<i>Bandereia simplicifolia</i>	B
<i>Cystisus sessilifolius</i>	H
<i>Tetragonolobus purpureus</i>	H
<i>Ulex americanus</i>	H
<i>Ulex europaeus</i>	H
<i>Vicia graminea</i>	H

En algunas investigaciones se reporta que la lectina facilita la agregación celular, formando puentes entre las células incrementando la cantidad de eventos de adhesión celular. Al modificarse la distribución del receptor, se facilita el contacto célula-célula.(33)

Otros científicos afirman, que después de haber hecho experimentos con lectinas marcadas radiactivamente, el incremento en la aglutinación es consecuencia de cambios en la distribución topográfica de los receptores y también debido a la fluidez de la membrana que permite la agrupación de los receptores en uno de los polos.

Hay lectinas que por ser moléculas muy pequeñas, no alcanzan a enlazar los receptores y es necesario agregar polímeros, para incrementar la aglutinación.(45)

Otros factores importantes que influyen en la asociación carbohidrato lectina son el pH y la temperatura. La mayoría de las aglutininas reaccionan entre un pH de 4.5 a 11. A pH bajo la carga de la superficie celular es reducida y a pH alcalino hay una gran interacción celular. La temperatura está relacionada con la fluidez de la membrana y ésta necesita fluidez para que los receptores se muevan.(38) Las aglutininas pueden presentar reacción en valores de 4 C a 40 C. A 0 C la movilidad de los receptores es reducida.(1) Los agentes que reducen la polaridad como el etilenglicol incrementan la especificidad de la lectina. Algunos iones metálicos también ejercen un efecto no específico en la interacción carbohidrato lectina facilitando la

complejación entre las entidades con una carga similar o favoreciendo la hidrofobicidad.(13) Las lectinas que requieren iones metálicos son muy sensibles a las variaciones de pH. A pH bajos los iones metálicos son liberados y la lectina pierde su actividad.(29,30)

Es importante mencionar la influencia de la pureza de la lectina, como es el caso de la Hura crepitans, que al purificarla, su actividad hemaglutinante se incrementa 300 veces más.(11)

Las lectinas poseen afinidad a glicoproteínas, células (como a los glóbulos rojos ya mencionados) y virus, ya que se identifican por interactuar, reconocer o ligar carbohidratos u oligosacáridos en la misma forma en que lo hacen los anticuerpos.

Las lectinas no alteran la composición de los carbohidratos, por lo que no tienen propiedades enzimáticas, pero guardan semejanza a las enzimas en el mecanismo que explican su especificidad, empleando el modelo de la "llave" y la "cerradura", ya que reconocen a su estructura particular. También tienen más de un sitio de reconocimiento, por lo que pueden adherirse a uno o más receptores, pues son polivalentes.(45)

Se puede invertir el fenómeno de agregación adicionando una solución de carbohidratos. Esta prueba es semejante a la acción de inhibidores competitivos de las enzimas. Los carbohidratos forman parte del determinante antigénico del grupo sanguíneo

correspondiente. Las lectinas que son específicas para el grupo sanguíneo A, se inhibirán con N-acetil-galactosamina y sus derivados glicosídicos, en cambio las lectinas que son específicas para el grupo sanguíneo O (H) serán inhibidas con L-fucosa. Muchas de las lectinas pueden ser inhibidas por carbohidratos sencillos, considerando así que son específicas para determinada azúcar. Las α -glicosilproteínas naturales son mejores inhibidores que los glicanos libres lo que se sugiere que se produce interacciones hidrofóbicas durante la interacción lectina carbohidrato.

Si los eritrocitos son tratados con enzimas tales como tripsina, pronasa o papaina, la capacidad de aglutinación aumenta notablemente, ya que se cree que hay un 'desenmascaramiento' de un número grande de receptores, los cuales se vuelven accesibles. También el remover residuos de ácido siálico por neuraminidasa puede llevar a un incremento en la aglutinación, por la exposición de ciertas terminales, como residuos de galactosa.(38)

Las lectinas de las leguminosas han sido divididas en dos grupos, las encontradas en los géneros *Len*, *Pisum* y *Vicia*, compuestas de dos cadenas de alto y dos de bajo peso molecular. Las cadenas muestran una secuencia homóloga de aminoácidos, son específicas a glucosa, manosa y estimulan la mitosis en los linfocitos. El otro grupo de lectinas, está constituido por cuatro cadenas similares o diferentes, tienen especificidad a varios azúcares. La concanavalina A (Con A) de la *Canavalia*

ensiformis pertenece a este grupo. La Con A tiene regiones con una secuencia homóloga de aminoácidos.(14)

Otros autores las agrupan como lectinas termolábiles y termoestables. Esta división se ha observado en el germen de trigo, al exponerlo a 110 C por 30 minutos en autoclave. La actividad de lectina se presentó en las fracciones de gliadina y glutenina ácido-solubles. Este acontecimiento se ha relacionado con individuos que genéticamente tienen intolerancia al germen de trigo ocasionándoles enteropatía. Douglas y Weiser en 1976, sugirieron que el germen de trigo causa daño intestinal a algunos pacientes. Estas lectinas a las que se refieren los investigadores deben ser las lectinas termoestables.(5,36)

Respecto a la composición de aminoácidos se reporta que la mayoría de las lectinas carecen de cisteína y metionina y tienen un contenido alto en ácido aspártico, lo cual explica su bajo punto isoelectrico.(9,34)

Los mitógenos son herramientas útiles en Inmunología porque activan diferentes poblaciones de linfocitos, evaluando así la función de éstos. Tales sustancias inducen la síntesis del DNA, dan origen a blastos y a la división de los linfocitos.(14)

Un gran número de lectinas, especialmente las aisladas de plantas, tienen la capacidad de inducir la transformación blastogénica de diversas especies de linfocitos. Como la lectina de *Phaseolus limensis* que actúa en linfocitos humanos, pero no en linfocitos de ratón. En cambio las lectinas de Lens

culinaris y Phaseolus coccineus actúan en ambas especies. Evidencias experimentales han sugerido que los sialoconjugados de la superficie celular, en particular los sialoglicolípidos de la membrana están involucrados en la respuesta blastogénica de las células linfoides. La implicación de sialoconjugados como aceptores por ciertas lectinas mitogénicas han sugerido que las lectinas que se enlazan a B-D-galactosa o N-acetilgalactosamina subterminal induce mitogénesis solo después del tratamiento de las células con neuraminidasa.(40)

Hay lectinas que producen el efecto mitogénico, unas tienen habilidad de estimular solo a los linfocitos T y otras a los linfocitos B. A pesar de tener efectos distintos en los dos tipos de poblaciones celulares, las lectinas actúan en ambas células. La fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A (Con A) estimulan poblaciones de linfocitos T (2,4), el mitógeno de la fitolaca (PWN) estimula a ambos linfocitos T y B de diferentes especies de animales y el mitógeno hidrosoluble de Nocardia (NESH) que activa preferentemente a las células B.(4) El mitógeno de la fitolaca, parece ser más potente estimulante de células B en el humano que los lipopolisacáridos.(10) Hay otras lectinas mitogénicas como es la lectina del escarabajo Allomyrina dichotoma, que presenta actividad en linfocitos de ratón, rata y humano.(22)

Se han llevado a cabo investigaciones en donde se demuestra que los linfocitos de sangre periférica de carnero, responden mejor al mitógeno que los linfocitos de la linfa. Esto es debido

a que los macrófagos se encuentran en cantidades pequeñas en la linfa. La baja cantidad de macrófagos es el factor limitante en este sistema. (12) Púes tienen una gran cantidad de funciones en la respuesta inmunitaria. Los macrófagos tienen gran importancia en la presentación de los antígenos a los linfocitos. Púes el macrófago marcará que células T serán inducidas para ser estimuladas. También secretan sustancias biológicamente activas que modularán la magnitud y tipo de respuesta de los linfocitos T y B, aumentando o suprimiendo la división celular o la diferenciación. (14)

La actividad mitogénica va en función de la dosis, algunos trabajos reportan, que un extracto crudo requiere para inducir su máxima activación dosis más altas que el extracto purificado. Este es el ejemplo de la lectina de la *Lathyrus sativus*, en donde se necesita 0.5 mg/ml del extracto crudo para inducir la mayor activación y en cambio con la fracción purificada por afinidad cromatográfica, la estimulación máxima se logró adicionando 50 µg/ml de la fracción. (9)

Se ha visto que algunas lectinas como la *L. ochrus* disminuye la capacidad de inducir mitosis (3 a 10 veces) al separar a las isolectinas, en cambio presenta un efecto sinérgico al encontrarse las dos. (3)

Es interesante hacer notar, que la mayoría de las lectinas mitogénicas son específicas a D-glucosa y D-manosa. (45,9)

Otra de las propiedades biológicas de las lectinas es la modulación de la respuesta inmune. Al igual que la actividad mitogénica, dependerá de la dosis, estando en función de la naturaleza del antígeno que provoca la respuesta inmune y del intervalo de aplicación. La primera inmunización local fue ejecutada por Romer (1901) quien aplicó pequeñas dosis repetidas de abrina en una de las conjuntivas de un conejo, la inmunización a dosis tóxicas se desarrolló solo en el ojo tratado. Algunas lectinas como la concanavalina A y el mitógeno de la fitolaca son conocidos por suprimir la respuesta inmune normal. Se han investigado otras lectinas como *Amaranthus leucocarpus* y *Machaerocereus eruca* y se ha visto que éstas bloquean la producción de anticuerpos, produciendo inmunosupresión. Aparte de la propiedad de modular, también las lectinas antes mencionadas inhiben la actividad fagocítica de los macrófagos. (43)

Respecto a la toxicidad, se ha visto que ciertas lectinas producen lesiones patológicas en animales de experimentación. Se ha observado que la ricina, abrina y crotina, producen afecciones macroscópicas y microscópicas similares. Las hemorragias locales se observan frecuentemente en el sitio de inyección. La acción tóxica de la ricina puede ser explicada por una interferencia con algún proceso metabólico en el hígado. En 1966 Dirheimer observó que la ricina provocaba un aumento en los valores de urea, glucosa, bilirrubina, transaminasas y ácido láctico en ratas. La hipoglicemia observada por Hintz y colaboradores (1967) en ratas alimentadas con dieta de frijol crudo puede también ser

indicativa de reducción en la absorción intestinal de glucosa. La reacción entre la aglutinina y la membrana celular resulta en una alteración de la función celular produciendo el efecto tóxico. Solo aquellas células relacionadas a los receptores por la lectina respectiva pudieran ser afectadas. (24)

El mecanismo de acción en los casos de la ricina y de la abrina han sido estudiados por Olsner y Phil en 1976. Se sabe que tanto la abrina como la ricina constan de dos puentes de azufre. Las cadenas B son las que se enlazan a carbohidratos de la membrana y permiten así la internalización de las cadenas A que vienen a bloquear la síntesis de proteínas y provocan la muerte celular.

Los usos de las lectinas se pueden resumir en:

- 1) Tipificación de grupos sanguíneos
- 2) Tipificación de personas secretoras
- 3) Estudio de la arquitectura celular y de los cambios sufridos por una transformación maligna
- 4) Modulación de la respuesta inmune en el transplante de órganos y tejidos
- 5) Preparación de reactivos tóxicos específicos dirigidos contra células tumorales
- 6) Estudios de nutrición para la evaluación de alimentos
- 7) Evaluación de los linfocitos humanos
- 8) Análisis de la distribución de los sacáridos de la membrana de los espermatozoides para encontrar las diferencias entre el semen eyaculado. (25,31,33,36,41)

Grupos sanguíneos:(14)

En la superficie de los eritrocitos se encuentran determinantes antigénicos. Estos son el resultado de los genes, y se han clasificado en grupos sanguíneos. Los antígenos son heredados como productos de un gen sencillo o de un conjunto de genes estrechamente ligados.

Grupos ABO:(14)

Las investigaciones de Landsteiner en 1901 fueron acerca de la aglutinación de los eritrocitos humanos al ponerse en contacto con sueros humanos. Encontró que las células de personas del grupo B aglutinaban suero A y personas del grupo A aglutinaban suero B. Si las células no aglutinaban ningún suero pertenecen al grupo sanguíneo O. Estas personas tienen anticuerpos anti A y anti B y el último grupo el cual no presenta anticuerpos es el AB.

Los determinantes antigénicos A y B están constituidos por carbohidratos. Los antígenos pueden encontrarse en los líquidos corporales en forma soluble. La estructura A y B se muestra en la figura 1.

La cadena precursora de los antígenos es llamada sustancia H, esta formada por N-acetil glucosamina, galactosa y fucosa. La N-acetil galactosamina se encuentra en el grupo A y la galactosa en el grupo B están unidos al último residuo de la galactosa de

la cadena. La diferencia encontrada entre las sustancias del grupo A y B es el reemplazo del grupo OH en B por el grupo CH CONH en A.

Las glicoproteínas de los grupos sanguíneos poseen pesos moleculares cercanos a 300 000. La diferencia entre los grupos A y B afecta solo a una parte pequeña de en la macromolécula.

Los genes alélicos A, B, y O determinan a los grupos sanguíneos ABO. Estos genes producirán las enzimas transferasas las cuales conjugan los azúcares al carbohidrato precursor. Estas transferasas son específicas. La transferasa A para la N-acetilgalactosamina y la transferasa B para la galactosa. El gen O no produce transferasa. Las personas que pertenecen a este grupo sanguíneo solo poseen la sustancia precursora, la sustancia H.

La cadena precursora es influida por una transferasa que conjugó la fucosa a la galactosa.

El grupo sanguíneo A es subdividido en los subgrupos A₁ y A₂ en base al número de sitios antígenicos A sobre el eritrocito. Las personas que pertenecen a los grupos A y AB el 80% se encuentran dentro el subgrupo A₁.

La gran cantidad del antígeno sobre los eritrocitos A₁, se traduce en la formación de una especificidad antígenica nueva, pero relativamente débil, como consecuencia de dos oligosacáridos A muy cercanos.

Las personas del subgrupo A_2 pueden tener anticuerpos A_1 . Hay subtipos de A que poseen una menor cantidad del compuesto A que los eritrocitos A_2 . Los eritrocitos A_3 reaccionan con una aglutinación muy escasa con anti-A, los eritrocitos A_x no son aglutinados con anticuerpos anti-A del suero del grupo B, en contacto con el suero del grupo O es capaz de producir una reacción débil.

Las lectinas se emplean para la diferenciación de los subgrupos A_1 y A_2 . Este es el ejemplo de *Dolichos biflorus* que aglutina solo a las células A_1 . (14)

Grupo Sanguíneo	Antígeno	Anticuerpo
A_1	$A+A_1$	anti-B
A_2	A+H	anti-B (anti- A_1)
B	B	anti-A
O	H	anti-A y anti-B
A, B	$A+A_1+B$	----
A_2B	$A+B(+H)$	(anti- A_1)

Aglutinación:(14)

Las reacciones de aglutinación y de precipitación son muy utilizadas en las técnicas de los laboratorios. Estas reacciones tienen un alto grado de sensibilidad.

En las reacciones de aglutinación los reactivos son el antígeno y el anticuerpo.

Las reacciones de aglutinación se subdividen en aglutinación directa e indirecta o pasiva.

La aglutinación directa: aglutinación de un antígeno forme como eritrocitos, leucocitos y microorganismos que al ponerlos en contacto con el anticuerpo formarán acúmulos apreciables a simple vista. Estas reacciones son muy empleadas en el diagnóstico clínico.

La aglutinación indirecta: aglutinación del antígeno en solución adsorbido en partículas inertes. Las partículas empleadas con mayor frecuencia son los glóbulo rojos, bacterias muertas, bentonita y latex poliestireno.

Las ventajas de estas determinaciones es que son rápidas, poseen mucha sensibilidad y no requieren equipo muy costoso.

Inhibición de la aglutinación:

El anticuerpo se incuba previamente con el antígeno homólogo soluble o de reacción cruzada. Posteriormente se agregan eritrocitos recubiertos con el antígeno.

Linfocito:(14)

El linfocito es una célula mononuclear con cromatina densamente empaquetada. Presenta un citoplasma muy pequeño. Se dividen en dos tipos de linfocitos, linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos T se desarrollan en el timo son necesarios para diferentes tipos de reacciones como regular la producción de inmunoglobulinas, destruir las células infectadas y medir la hipersensibilidad tardía.

Los linfocitos B se desarrollan de una célula madre pluripotencial que puede generar todos los diferentes tipos de células hematopoyéticas. Se generan en la médula ósea, son precursores de la células plasmáticas que producen anticuerpos.

Linfoblasto:

Tienen un núcleo que se distingue por poseer eucromatina laxa, núcleo grande y un gran volumen citoplasmático. Mide de 15 a 30 micras. Se encuentran *in vivo* en los ganglios linfáticos e *in vitro* en cultivos de linfocitos estimulados por mitógenos.

Distribución de los linfocitos en diversos tejidos del hombre:
porcentaje aproximado

Tejido	Células T	Células B
Sangre periférica	55-75	15-30
Médula ósea	<25	>75
Linfa	>75	<25
Ganglio linfático	75	25
Bazo	50	50
Amígdalas	50	50
Timo	>75	<25

Activación de los linfocitos:

Es una técnica *in vitro*, empleada para evaluar la inmunidad en los enfermos infecciosos, que padecen algún cáncer, autoinmunidad e inmunodeficiencia. La transformación linfocitaria es un concepto semejante utilizado por Nowel en 1960, que describe los cambios que resultaban cuando los linfocitos eran estimulados con mitógenos.

Mitógenos:(14)

Los mitógenos son sustancias capaces de estimular a los linfocitos *in vitro* entre ellas están productos de bacterias, enzimas sustancias poliméricas, que provocan la síntesis del DNA, la formación de blastos y la división de los linfocitos.

Dentro de los fitomitógenos (lectinas) encontrados más comunmente en la literatura están:

- Fitoheماغlutinina(PHA)
- Concanavalina A(Con A)
- Mitógeno de la fitolaca (PWN)

Mitosis:(8)

La mitosis es un mecanismo por el cual la célula distribuye en cantidades equivalentes los diferentes componentes que se han

duplicado durante la interfase. Para su estudio, el fenómeno se divide en profase, metafase, anafase y telofase.

Profase:

El comienzo de la profase es indicativo por la aparición de los cromosomas como fibras delgadas en el interior del núcleo. La condensación ocurre por un proceso de enrollamiento y un cambio simultáneo en los bloques de heterocromatina. Al mismo tiempo, la célula comienza a ser viscosa. Cada cromosoma en la profase está compuesto por dos filamentos enrollados, los cromátidos. Los cuales son el resultado de la replicación de los cromosomas durante el período "S". Al avanzar la profase, los cromátidos comienzan a cortarse y a espesarse. Los cromosomas se aproximan a la envoltura nuclear. El movimiento centrifugo de los cromátidos indican que se acerca la desintegración de la membrana nuclear y el fin de la profase, en este tiempo cada cromosoma parece estar compuesto de dos elementos cilíndricos paralelos que se encuentran próximos. Se observan otros cambios como la reducción del nucleolo y su desintegración dentro del nucleoplasma.

Mientras se llevan a cabo los procesos anteriores, en el núcleo del citoplasma el cambio sobresaliente es la formación del huso, hecho de microtúbulos. La aparición del huso está relacionada a la existencia de los centriolos. En la profase temprana hay dos pares de centriolos. Cada uno rodeado por el áster, compuesto por microtúbulos que radian en todas direcciones. Los dos pares de centriolos migran a lo largo con

los ásteres describiendo una trayectoria circular a través de los polos. Los centriolos se replican durante la interfase generalmente durante el periodo "S".

Metafase:

Algunas veces la transición entre profase y metafase es llamada prometafase. Este es un periodo muy corto en el cual la envoltura nuclear se desintegra y los cromosomas están en un desorden aparente. Después de que las fibras del huso invaden el área central, sus microtúbulos se extienden. Los cromosomas empiezan a aproximarse por los cinetocoros a algunas de las fibras del huso, ellos padecen movimientos oscilatorios hasta que comienzan a orientarse radialmente en el plano ecuatorial y forman la placa ecuatorial.

La mitosis en la cual el huso tiene centriolos y ásteres es llamada astral y se presenta en células animales y algunas plantas inferiores. La mitosis en que los centriolos y ásteres están ausentes es llamada anastral y se da en plantas superiores, incluyendo todas las angiospermas y la mayoría de las gimnospermas.

En cierta manera, en la mitosis astral la formación del huso es un mecanismo, el cual dirige la distribución de los centriolos entre las dos células hijas.

Anafase:

El cambio de fuerzas que caracteriza a la metafase es roto por la separación de los centrómeros. Los centrómeros se mueven separadamente y los cromátides se apartan, comenzando su inmigración a través de los polos. El centrómero siempre dirige el resto de la cromátide o cromosoma hijo. Durante la anafase los microtúbulos de las fibras cromosomales se acortan de un tercio a un quinto del largo original.

Telofase:

La migración de los polos de los cromosomas marca el comienzo de la telofase. Los cromosomas comienzan con desenrollarse y se vuelven menos condensados, de alguna forma recapitulando a la profase pero en dirección inversa. Los cromosomas se reúnen en masas de cromatina que se rodean por segmentos discontinuos de envoltura nuclear. Estos segmentos se funden para hacer las dos envolturas nucleares. Durante las fases finales el nucleolo reaparece. Ocurre la citocinesis que es el proceso de separación y segmentación del citoplasma.

Mitosis in vitro: (14,8)

Los linfocitos pueden ser inducidos a mitosis in vitro cultivándolos en presencia de mitógenos, en este caso lectinas. 72 horas es el tiempo en el cual la mayor parte de los mitógenos producen su máximo efecto sobre la síntesis del DNA. Para poder observar la mitosis a través del microscopio a los cultivos se les agrega colchicina que detendrá a las células en

la etapa de metafase. Los mitógenos son sustancias que estimulan a los linfocitos y no requieren de huésped sensibilizado.

Fig.1 ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS DETERMINANTES ANTIGENICOS A,B Y H

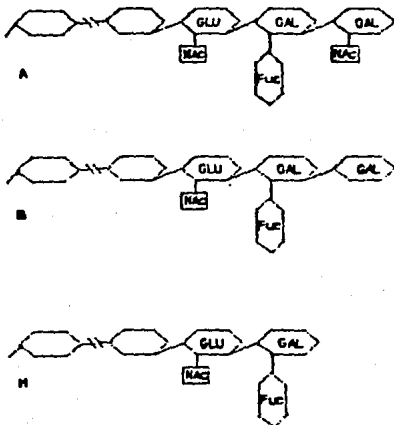
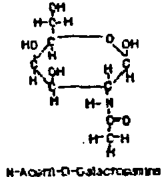
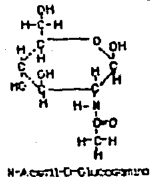
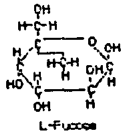
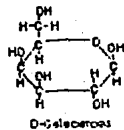
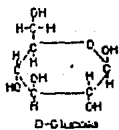


Diagrama de la estructura química propuesta de los determinantes antigénicos A,B y H de los grupos sanguíneos. Los azúcares están unidos por cadenas de carbohidratos a una cadena peptídica. Glu=glucosa, Gal=galactosa, Fuc=fucosa y Nac=grupo N-acetilo.

Fig.2

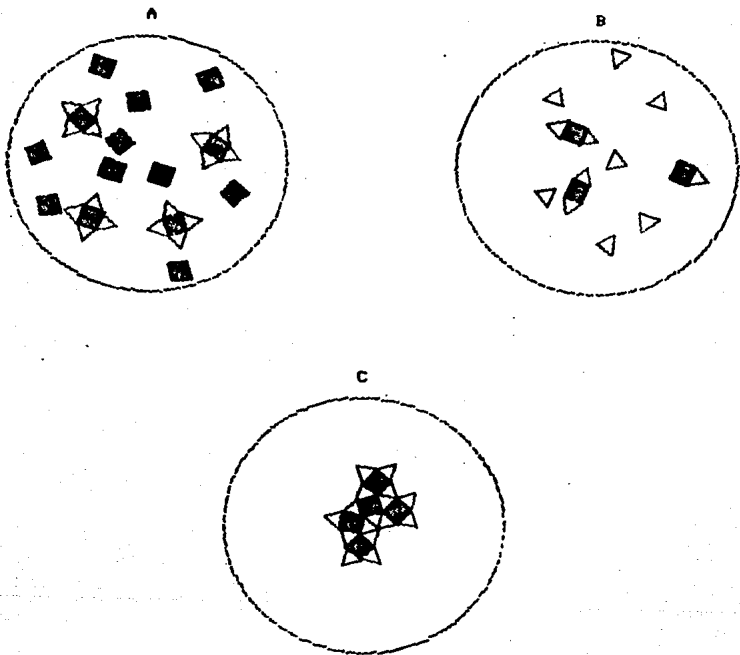
MONOSACÁRIDOS ENCONTRADOS EN MEMBRANAS



Representación de monosacáridos encontrados en membranas externas de células animales.

Fig.3

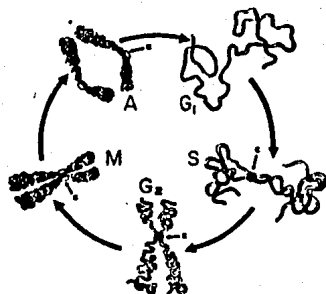
FENOMENO DE ZONA



A=Exceso de anticuerpo B=Exceso de antigeno C=zona de equivalencia

Fig.4

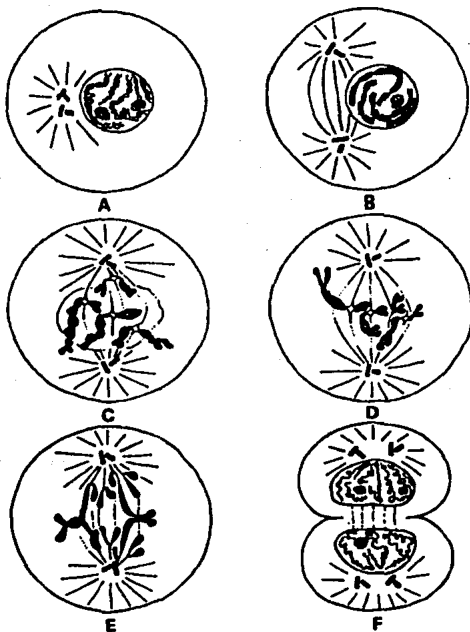
CICLO CELULAR



Condensación y descondensación de los cromosomas. G₁, los cromosomas están completamente dispersos; S, ocurre la duplicación; G₂, la condensación comienza. M, metafase y A, anafase en donde los centrómeros son visibles.

Fig.5

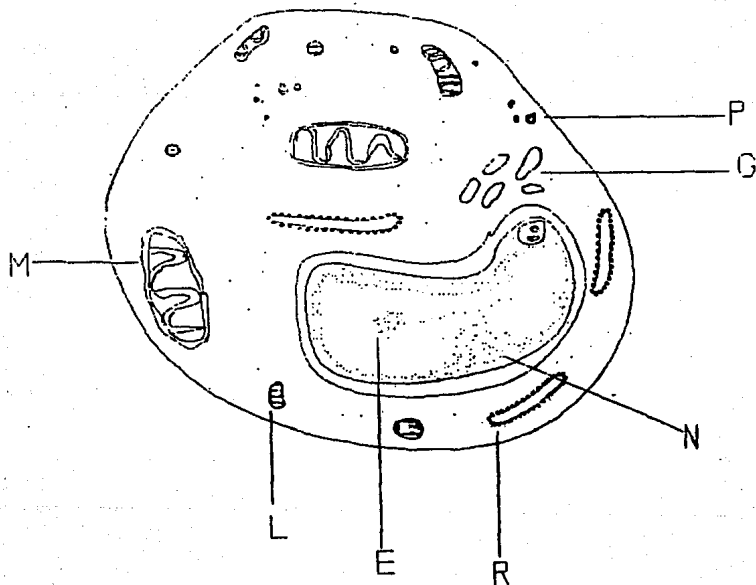
MITOSIS



A=profase, los cromosomas y nucleolos se muestran como hilos delgados, en el citoplasma se observa el áster con los pares de centriolos. B=profase en etapa avanzada en la cual los cromosomas se han acortado. C=profase tardía, la envoltura nuclear se desintegra y los cromosomas se agregan a las fibras del huso. D=los cromosomas se agregan a lo largo del plano ecuatorial. E=anafase, los cromosomas hijos son precedidos por los centrómeros moviéndose hacia los polos. F=telofase, el nucleolo hijo está en el proceso de reconstitución.

Fig.6

LINFOLBLASTO



Representación de un linfoblasto. L=lisosoma, G=golgi, P=polirribosomas, N=nucleolo, R=retículo endoplasmático granuloso, E=eucromatina, M=mitocondria.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS:

MATERIAL:

Para este estudio se emplearon las siguientes semillas de leguminosas colectadas en distintas partes del país:

Nombre Común:	Nombre Científico:	Lugar de origen:
-Cacahuanano	-Gliricidia sepium	-Oaxaca
-Colorín	-Erythrina americana	-Valle de México
-Frijol del Monte	-Phaseolus lunatus	-Sinaloa
-Frijol Negro Jamapa	-Phaseolus vulgaris	-Edo. de México
-Jackbean	-Canavalia ensiformis	-Veracruz
-Lenteja	-Lens esculenta	-D.F. (tienda de autoservicio)
-*Nescafé*	-Stizobium cinerium	-Veracruz
-Pata de Vaca	-Bauhinia purpurea	-Edo. de Morelos
-Tabachín	-Delonix regia	-Morelos

MÉTODOS:

1) Preparación de los extractos crudos de lectinas:

Después de obtener las muestras finamente molidas, (desengrasadas si se ameritó), se suspendieron 2.5 g en 25 ml de solución de cloruro de sodio al 1% y se efectuó la extracción con agitación mecánica durante dos horas a 300 rpm. Pasado este tiempo, se centrifugó el extracto a 3000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de vidrio de poro grueso con ayuda de vacío, en algunos casos el residuo se lavó con más solución salina al 1%, llevando los extractos al volumen inicial.

Se dividieron los extractos en dos porciones una con 10 ml de extracto y otra de 25 ml y ambos fueron congelados para su posterior análisis.

2) Determinación de proteínas:

Se utilizó el método de Lowry modificado por Hartree (17). Esta determinación esta basada en la formación del complejo de Cu, Na y K con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se utilizó un estándar de albúmina con una concentración de 400 μ g/ml, con el cual se realizó la curva estándar.

Curva estándar:

Se midieron alícuotas de 0.1, 0.3, 0.7 y 0.9 ml del estándar de albúmina, se utilizó un blanco de agua. En la figura 7 se muestra la curva estándar obtenida. Por lo que se refiere a los

problemas (extractos crudos), se realizaron diluciones de 1:50 de cada uno de estos, tomando alícuotas de 0.5 ml excepto en el caso del Tabachin que se hizo una dilución 1:25, tomando también una alícuota de 0.5 ml. También se realizó esta determinación en la fitohemaglutinina comercial, la cual se utilizó como control positivo en la actividad mitogénica, de esta se tomó una alícuota de 0.15 ml.

Se diluyó con agua destilada a un volumen final de 1ml. Posteriormente se agregó 0.9 ml del reactivo A a cada tubo. Se incubaron 20 minutos a 50 C enfriándolos 12 minutos a temperatura ambiente. Después se les añadió 0.1 ml del reactivo B dejándolos reposar 10 minutos. Por último se les agregó 3.0 ml del reactivo C, se agitaron, incubándose inmediatamente a 50 C durante 5 minutos. Pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente. Los tubos fueron leídos a 500 nm.

Preparación de los reactivos: A, B y C.

El reactivo A fué preparado con 2.0 g de Tartrato de sodio y potasio más 100.0 g de Carbonato de sodio diluidos con 100.0 ml de Hidróxido de sodio 1M y posteriormente se aforó a un litro con agua destilada.

Al reactivo B se le añadió: 2.0 g Tartrato de sodio y potasio, 1.0 g de Sulfato de cobre y 10.0 ml de Hidróxido de sodio 1M. Aforándose a 100 ml con agua destilada.

En el caso del reactivo C, se hizo una dilución 1:15 del reactivo de Folin Ciocalteu.

3) Determinación semicuantitativa de hemaglutininas (6,7,19).

Para esta determinación se utilizó únicamente sangre de conejo.

Preparación de la sangre:

Una vez que se sangró al animal, vía punción cardiaca. La sangre se colocó en un matraz pequeño conteniendo 1ml de citrato de sodio, se agitó y trasvasó a tubos, así la sangre fue centrifugada eliminándose el plasma. Se lavó 3 veces con solución salina al 0.85% para eliminar la hemoglobina liberada por hemólisis.

La relación paquete celular/solución salina fue de aproximadamente 1:5. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Después se ajustó la concentración al 4 %.

Sensibilización de los glóbulos rojos:

A cada 10 ml de suspensión de glóbulos rojos al 4%, se les adicionó 1 ml de solución de tripsina al 0.1% en solución salina, (actividad aproximada de la tripsina es de 10,000 unidades de BAEE por mg de proteína) y se colocaron en la incubadora por espacio de 1 hora a 37 C. Después se centrifugaron para eliminar la enzima y se lavaron con solución salina 0.85%.

Terminando el último lavado se resuspendió el paquete de glóbulos rojos en el volumen original.

Ajuste de la suspensión de glóbulos rojos:

Se tomó 1 ml de la suspensión de glóbulos rojos ya sensibilizados y se agregaron 4 ml de solución salina al 0.85%. Se leyó en el espectrofotómetro a 620 nm usando un adaptador de celdas que permite el paso de solo un haz de 1cm de luz, empleando como blanco solución salina al 0.85%.

La lectura que se debe obtener es de 25% \pm 3 de transmitancia. Por lo que se realizó una dilución para que la suspensión de glóbulos rojos quedara dentro de estos valores.

Microtitulación:

En las placas con fondo en *V para microtitulación, se colocó en cada pozo 50 μ l de solución salina al 0.85% con pipeteador evitando tocar las paredes del pozo.

A continuación se cargó el microdilutor de 50 μ l por contacto con la superficie del extracto y se procedió a realizar las diluciones sucesivas en las hileras o hilera escogida.

Por último se administró en cada pozo 50 μ l de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados y ajustados. Se rotó la placa en forma circular y se llevó a la incubadora a 37 C por espacio de una hora.

Lectura:

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se colocó la placa sobre el dispositivo de lectura. Se observó la imagen del fondo de los pozos de cada hilera de prueba en el espejo.

El título lo dió la máxima dilución que presenta aglutinación.

4) Actividad mitogénica(25):

Se utilizó como medio de cultivo F-10 el cual se preparó de la siguiente forma: 10 g de Polvo Nutrient F-10 (Nutrient Mixture F-10, Grand Island Biological Company) y 1.2 g de Bicarbonato de Sodio. Se aforó a 1 litro con agua destilada y se esterilizó por filtración en membrana Millipore de 0.22 Micras de diámetro. A este medio se le añadió 100 ml de suero de ternera, 100 u/ml de penicilina G, 100 μ g/ml de estreptomycin y 250 μ g/ml de anfotericina. Se llevó a un pH de 7.2 ± 0.3 .

La operación se realizó en campana de flujo laminar en condiciones estériles. En cada uno de los viales se colocó 5 ml del medio F-10, el extracto de la leguminosa y 1 ml de sangre total humana heparinizada.

Las dosis utilizadas de los extractos crudos de lectina fueron de: 20, 200, 100 y 10 μ g. Para llevar a cabo las diluciones para obtener estas dosis, se tomó en cuenta la concentración de proteína encontrada en cada uno de los extractos.

El primer experimento que se hizo de actividad mitogénica fué con la dosis de 20 microgramos. A todos los extractos se les llevó a esta concentración, porque es la concentración de proteínas a la cual el control positivo (fitohemaglutinina), presenta una buena actividad mitogénica.

Después se trabajaron con las dosis antes mencionadas, para poder comparar si las dosis en las que se presenta actividad difieren del control.

Al control negativo no se le añadió ningún extracto crudo de lectina.

Los cultivos se colocaron en la incubadora a una temperatura de 37 C durante 72 horas.

A las 71 horas se agregó 0.1 microgramos de colchicina por cultivo, para detener a las células en metafase.

La colchicina se preparó mediante 100 μ l de buffer de fosfatos 0.2 M (pH=7.2), 1 μ g de colchicina y 1 μ g de rojo de fenol.

Una vez añadida la colchicina se dejó una hora más en la incubadora para que se cumplan las 72 horas y a una temperatura de 37 C. Los cultivos se centrifugaron eliminando el sobrenadante y el botón se resuspendió en 3 μ l de una solución de KCl 0.075 M. Se dejaron con esta solución hipotónica por espacio de 45 minutos a temperatura de 37 C. Se volvió a centrifugar,

eliminando el sobrenadante y al botón una vez perfectamente resuspendido se le añadió 5 ml del fijador Carnoy, el cual está compuesto de 3 volúmenes de metanol por 1 volumen de ácido acético.

El botón se volvió a resuspender y se dejó en contacto con el fijador 10 minutos. Se centrifugó una vez más y se repitió este paso hasta que el fijador se observó transparente y el botón de color blanco.

El botón se resuspendió en 1 ml de solución fijadora y se dejaron caer 5 gotas de esta suspensión en el correspondiente portaobjetos, a una altura aproximada de 15 a 20 cm. Se fijaron a la llama, se dejaron enfriar y por último se lavaron con agua destilada.

Tinción:

Las laminillas se tificaron en May Greenwald durante 20 minutos, posteriormente se tificaron en Giemsa (diluido 1:10) durante 15 minutos. Se introdujeron en acetona 5 minutos. Después se sumergieron en acetona-xilol a partes iguales por 5 minutos. Por último en xilol por espacio de 5 minutos. Se montaron mediante bálsamo de Canadá.

Se contaron entre 5000 a 6000 células en seco fuerte para cada uno de los extractos crudos con sus correspondientes dosis. Diferenciando: Linfocitos, blastos y células en mitosis.

5) Hemaglutinación microscópica de los extractos crudos de lectinas utilizando sangre humana A Rh+:

Se mezcló el extracto crudo concentrado de cada una de las lectinas con sangre humana tipo A Rh+. Una gota del extracto y una gota de sangre. En el portaobjetos se colocó una gota de esta mezcla, la cual se extendió al poner el cubreobjetos. Se observaron las laminillas con el objetivo 40X. La determinación se hizo por triplicado. La capacidad hemaglutinante se midió subjetivamente con la escala - a +++++.

6) Citotoxicidad de los extractos crudos sobre las células contenidas en los cultivos (38):

Para realizar esta prueba, se aprovecharon los cultivos de sangre que tenían la dosis de 200 µg del extracto crudo de muestra utilizados para observar la actividad mitogénica. Después de que se agregó KCl 0.075 M y se centrifugó para eliminar el sobrenadante, se separó 1.0 ml del cultivo al cual se le añadió 1.0 ml de azul de tripán al 1 %, obteniendo así una dilución 1:2. Después de 5 minutos se observaron 100 células mediante el objetivo 40X. Las células teñidas se consideraron dañadas. La prueba se realizó por triplicado.

7) También se planeó la determinación de la aglutinación y toxicidad en otras células empleando en este estudio espermatozoides humanos (38):

El espermato humano se puso en contacto con el extracto crudo de lectina y 1% de azul de tripán. Después de 5 minutos se

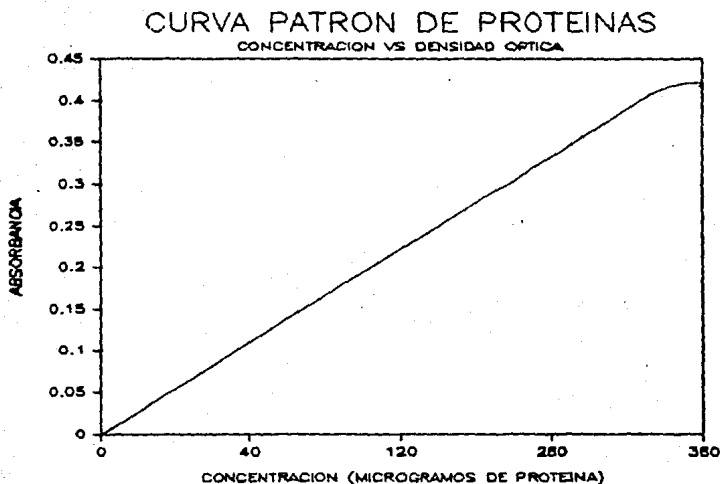
observó al microscopio con objetivo 40X. Se contaron 100 células de las cuales las teñidas fueron las que presentaron citotoxicidad. Se trabajó con cinco espermias de diferentes donadores y para cada uno de estos se manejó un control negativo el cual estaba constituido por el espermia y el azul de tripán. Este se efectuó con el fin descartar espermatozoides que aún sin la presencia del extracto se encuentren ya dañados.

RESULTADOS Y DISCUSION:

Proteina soluble:

En la figura 7 se muestra la curva estándar de proteínas, el método utilizado fué una modificación del de Lowry por Hartree (17). En la tabla no.1 se muestra el contenido de proteínas solubles encontradas en las nueve leguminosas estudiadas. Se puede ver que las semillas de más alta concentración fueron las de 'Nescafé', seguida por el Colorín. Las muestras con concentraciones más bajas fueron el Tabachín en primer lugar y la Lenteja. En general la concentración de proteínas investigadas en la mayoría de las muestras (no tomando en cuenta a las de baja concentración) fué alrededor de 20 g de proteína soluble en 100 g de muestra. Por lo que se refiere a la fitohemaglutinina comercial, el control positivo, la concentración encontrada al ser muy baja se reporta en microgramos por ml. La determinación de la concentración proteínas fué necesaria para tomarla como punto de referencia en la actividad mitogénica, al hacer las diluciones de los extractos crudos de lectinas a diferentes dosis.

FIGURA 7



CONCENTRACION $\mu\text{g}/\text{ml}$	ABSORBANCIA
0	0
40	0.066
120	0.170
280	0.345
360	0.414

LONGITUD DE ONDA: 500 nm

ESTANDAR DE ALBUMINA: 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$

ESPECTROFOTOMETRO COLEMAN G:20

Hemagglutininas:

En la tabla 2 se observa la determinación de hemagglutininas en sangre de conejo, en donde el título más alto que fué de 25 es encontrado en el Jackbean (17). Se corroboró en la bibliografía, en donde dice que esta leguminosa aglutina sangre de animales, una de ellas, la del conejo. A continuación se encuentra la Lenteja, presentando un título de 13. Se hace notar que el Frijol del Monte dió un resultado negativo en sangre de conejo, ya es sabido que la lectina de este frijol aglutina eritrocitos tipo A (17), el Cacahuanano y "Nescafé" tampoco presentaron aglutinación por lo que no son específicos a sangre de conejo. Es posible que se llegara a encontrar aglutinación con sangre de hamster que es menos específica que la del conejo.

A fin de mostrar los resultados de hemagglutininas de una manera menos subjetiva y aprovechando que se realizó la determinación de proteínas en los extractos, se puede expresar en términos de la mínima cantidad de proteína que es capaz de producir aglutinación, bajo las condiciones de trabajo, lo cual se obtiene indirectamente del propio título. En la tabla no. 3 se muestran estos resultados en miligramos de proteína soluble.

TABLA 1

 CONTENIDO DE PROTEINAS

MUESTRAS	g DE PROTEINA SOLUBLE EN 100 g DE MUESTRA
CACAHUANANO	17.98
COLORIN	22.77
FRIJOL DEL MONTE	19.56
FRIJOL NEGRO JAMAPA	17.65
JACKBEAN	19.00
LENTEJA	11.59
NESCAFE	22.87
PATA DE VACA	17.52
TABACHIN	9.00
CONTROL + (PHA) *	20 μ g/ml

: FITOHEMAGLUTININA

TABLA 2

DETERMINACION DE HEMAGLUTININAS EN SANGRE DE CONEJO

MUESTRAS	TITULO *
CACAHUANANO	0
COLORIN	3
FRIJOL DEL MONTE	0
FRIJOL NEGRO JAMAPA	12
JACKBEAN	25
LENTEJA	13
"NESCAFE"	0
PATA DE VACA	10
TABACHIN	3
CONTROL (-) (SOLUCION SALINA)	0

* ES LA MAXIMA DILUCION EN LA QUE SE PRESENTA AGLUTINACION

TABLA 3

MINIMA CANTIDAD DE PROTEINA CAPAZ DE PRODUCIR AGLUTINACION

MUESTRA	mg DE PROTEINA SOLUBLE (*)
CACAHUANANO	0.0
COLORIN	2.85
FRIJOL DEL MONTE	0.0
FRIJOL NEGRO JAMAFA	4.30×10^{-3}
JACKBEAN	5.66×10^{-7}
LENTEJA	1.41×10^{-5}
NESCAFE	0.0
PATA DE VACA	1.71×10^{-2}
TABACHIN	1.125

* mg DE PROTEINA SOLUBLE = $\frac{\text{CONCENTRACION DE PROTEINA SOLUBLE}}{\text{TITULO}}$

2

Actividad Mitogénica:

En la tabla no.4, se muestran los resultados de la actividad mitogénica de los diferentes extractos de lectinas, estandarizadas a la misma concentración, estos se pusieron en contacto con el cultivo de linfocitos, para observar la capacidad de estimulación de los lectinas. Se llevaron los extractos a la concentración de 20 μ g, pues esta fué la concentración obtenida al realizar la determinación de proteínas del control positivo (fitohemaglutinina comercial). Se contaron por cada extracto un total de 5000 a 6000 células.

Los cultivos que presentaron un mayor porcentaje de blastos fueron en primer lugar el del control positivo (fitohemaglutinina comercial), en segundo el extracto de Cacahuanano, seguido del extracto de Jackbean. Por lo que se refiere al porcentaje de mitosis, solo se encontró en 3 extractos, con un porcentaje de 7% en el control positivo, de 3% en el extracto de Jackbean y 1% en el Frijol del Monte. El resultado esperado era que en los extractos en que se encontró mayor porcentaje de blastos debió obtenerse el mayor porcentaje de mitosis. Uno de los posibles motivos de que no ocurriera así pudo haber sido que en éstos cultivos faltó tiempo para que entraran los linfocitos en mitosis. En la tabla no. 5 se puede ver que se consideró como el máximo porcentaje de blastos y mitosis al control positivo, al que se le dió el valor de 100 y se refirieron a él los extractos crudos de lectinas, obteniéndose el porcentaje con respecto al control positivo (fitohemaglutinina comercial).

TABLA 4
ACTIVIDAD MITOGENICA

DOSIS 20 μ g

MUESTRA	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
CACAHUANO	4109	80.40%	1002	19.60%			5111
COLORIN	4434	84.37%	700	13.63%			5134
FRIJOL DEL MONTE	4202	81.50%	953	18.48%	1	0.02%	5156
FRIJOL N. JAMAICA	4315	82.44%	919	17.56%			5234
JACKBEAN	4164	81.07%	969	18.07%	3	0.06%	5136
LENTEJA	4199	83.95%	803	16.05%			5002
NESCAFE	4828	87.70%	477	12.30%			5505
PATA DE VACA	4454	86.70%	683	13.30%			5137
TAMACHIN	4243	84.81%	760	15.19%			5003
CONTROL (-) (SIN EXTRACTO CRUDO)	4681	87.71%	656	12.29%			5337
CONTROL (+) (FITOHEMAGLUTININA)	4201	75.17%	1381	24.71%	7	0.13%	5509

EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS, BLASTOS Y MITOSIS ES CON RESPECTO AL TOTAL DE CELULAS EN CADA EXTRACTO

TABLA 5

PORCENTAJE DE BLASTOS Y MITOSIS EN RELACION AL CONTROL POSITIVO *

MUESTRAS	Z DE BLASTOS	Z DE MITOSIS
CACAHUANANO	79.32%	
COLORIN	55.16%	
FRIJOL DEL MONTE	74.79%	15.38%
FRIJOL N. JAHAPA	71.06%	
JACKBEAN	76.37%	46.16%
LENTEJA	64.95%	
NESCAFE	49.78%	
PATA DE VACA	53.82%	
TABACHIN	61.47%	
CONTROL (-) (SIN EXTRACTO CRUDO)	49.74%	
CONTROL (+) (FITOHEMAGLUTININA)	100.00%	100.00%

* EL CONTROL (+) SE TOMO COMO EL 100 %

En la tabla no. 6 se muestra la actividad mitogénica de las muestras. Se manejaron 3 concentraciones distintas del extracto crudo de lectina para cada cultivo. Se obtuvo el mayor porcentaje de blastos en el cultivo que tenía el extracto crudo de Jackbean en la dosis de 200 microgramos. A continuación se encuentra el control positivo y en tercer lugar el extracto de Cacahuanano en la dosis de 200 microgramos. Al igual que en la tabla no. 4 el porcentaje de blastos no concordó con el porcentaje de mitosis. Se encontró mitosis en el control positivo, en el Jackbean, el Frijol del Monte y el Frijol Jamapa.

El porcentaje mayor fue obtenido en el control positivo, seguido por el Jackbean que a la dosis de 100 microgramos mostró el mismo porcentaje que el Frijol del Monte a la dosis de 200 microgramos y en último lugar se encontró el Frijol Negro Jamapa presentando mitosis a la concentración de 200 microgramos.

Similar a la tabla no. 5, en la tabla no. 7 se relacionaron los porcentajes de blastos y mitosis al control positivo, tomando este último como el 100 %. Se puede observar que no existe correlación entre el porcentaje de blastos y mitosis en las muestras de Cacahuanano, Colorín, Lenteja, Pata de Vaca y Tabachín.

TABLA 6
 ACTIVIDAD MITOGENICA

MUESTRAS:

CACAHUANAND

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4235	80.85%	1003	19.15%			5238
100 μ g	4227	81.90%	934	18.10%			5161
10 μ g	4248	82.25%	917	17.75%			5165

COLORIN

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4320	84.33%	803	15.67%			5123
100 μ g	4253	85.01%	750	14.99%			5003
10 μ g	4334	86.39%	683	13.61%			5017

FRIJOL DEL MONTE

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4337	83.40%	857	16.48%	6	0.12%	5200
100 μ g	4433	86.30%	701	13.65%	3	0.06%	5137
10 μ g	4821	88.96%	597	11.02%	1	0.02%	5419

FRIJOL NEGRO JAMAPA

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4420	86.56%	484	13.40%	2	0.04%	5106
100 μ g	4391	87.04%	453	12.94%	1	0.02%	5045
10 μ g	4497	89.67%	517	10.31%	1	0.02%	5015

TABLA 6 (CONTINUACION)

ACTIVIDAD MITOGENICA

MUESTRAS:

JACKRABAN

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	3743	73.84X	1322	26.08X	4	0.08X	5069
100 μ g	4048	78.51X	1102	21.37X	6	0.12X	5156
10 μ g	4178	81.79X	927	18.15X	3	0.06X	5108

LENTEJA

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4240	82.36X	708	17.64X			5148
100 μ g	4348	86.08X	703	13.92X			5051
10 μ g	4323	86.43X	679	13.57X			5002

NESCAFE

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4334	84.40X	801	15.60X			5135
100 μ g	4616	86.07X	747	13.93X			5363
10 μ g	4393	85.42X	750	14.58X			5143

PATA DE VACA

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4471	86.45X	701	13.55X			5172
100 μ g	4447	86.52X	693	13.48X			5140
10 μ g	4571	87.10X	677	12.90X			5248

TABLA 6 (CONTINUACION)

ACTIVIDAD MITOGENICA

MUESTRAS:

TABACHIN

DOSIS	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
200 μ g	4285	84.40%	792	15.60%			5077
100 μ g	4249	84.71%	767	15.29%			5016
10 μ g	4375	85.58%	737	14.42%			5112

CONTROLES

	LINFOCITOS		BLASTOS		MITOSIS		TOTAL DE CELULAS
	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	No. DE CELULAS	PORCENTAJE	
CONTROL (+) (FITOHEMAGLUTININA)	3843	74.97%	1274	24.85%	9	0.18%	5126
CONTROL (-) (SIN EXTRACTO CRUDO)	4524	87.32%	657	12.68%			5181

EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS, BLASTOS Y MITOSIS ES CON RESPECTO AL TOTAL DE CELULAS PARA CADA DOSIS EN CADA EXTRACTO CRUDO DE LECTINAS

TABLA 7.

PORCENTAJE DE BLASTOS Y MITOSIS EN RELACION AL CONTROL POSITIVO *

MUESTRAS		
CACAHUANANO		
DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 μ g	77.05X	
100 μ g	72.82X	
10 μ g	71.43X	
COLORIN		
DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 μ g	63.07X	
100 μ g	60.32X	
10 μ g	54.78X	
FRIJOL DEL MONTE		
DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 μ g	66.31X	65.72X
100 μ g	54.91X	33.26X
10 μ g	44.33X	10.51X
FRIJOL NEGRO JAMAPA		
DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 μ g	53.90X	22.31X
100 μ g	52.08X	11.29X
10 μ g	41.48X	11.36X

TABLA 7 (CONTINUACION)

JACKBEAN
=====

DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 Mg	104.93%	44.94%
100 Mg	86.00%	66.28%
10 Mg	73.02%	33.45%

LENTEJA
=====

DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 Mg	70.97%	
100 Mg	56.00%	
10 Mg	54.62%	

NESCAFE
=====

DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 Mg	62.76%	
100 Mg	56.04%	
10 Mg	58.68%	

PATA DE VACA
=====

DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 Mg	54.53%	
100 Mg	54.25%	
10 Mg	51.90%	

TABLA 7 (CONTINUACION)

TABACHIN
=====

DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
200 μ g	62.77%	
100 μ g	61.52%	
10 μ g	58.01%	

CONTROLES
=====

DOSIS	% DE BLASTOS	% DE MITOSIS
CONTROL (+) (FITOHEMAGLUTININA)	100.00%	100.00%
CONTROL (-) (SIN EXTRACTO CRUDO)	51.02%	

* EL CONTROL (+) SE TOMO COMO EL 100 %

Hemaglutinación:

En la tabla no. 8, se muestran los resultados de la aglutinación obtenida con los extractos crudos de lectina frente a eritrocitos de sangre A+. Este efecto se observó a través del microscopio subjetivamente con escala de - a ++++. Los que presentaron la máxima aglutinación fueron el Frijol del Monte y la Lenteja, esto significa que estos extractos tienen gran cantidad de receptores para la N-acetilgalactosamina y se sabe por trabajos anteriores que los eritrocitos de este tipo son aglutinados de manera específica por las lectinas de *Phaseolus lunatus*: Frijol del Monte. Si se comparan estos resultados con los obtenidos con eritrocitos de sangre de conejo se comprueba la especificidad de *Phaseolus lunatus* (tabla 2) que con estos eritrocitos no se observa aglutinación. Un caso contrario es el Jackbean que muestra gran actividad aglutinante con los eritrocitos de conejo y poca con los de sangre humana tipo A Rht.

TABLA 8

HEMAGLUTINACION MICROSCOPICA DE EXTRACTOS CRUDOS DE LECTINAS

 UTILIZANDO SANGRE HUMANA A Rh+

MUESTRAS	AGLUTINACION		
CACAHUANANO	-		
COLORIN	+	+	
FRIJOL DEL MONTE	+	+	+
FRIJOL NEGRO JAMAPA	+	+	
JACKBEAN	+	+	
LENTEJA	+	+	+
NESCAFE	-		
PATA DE VACA	-		
TABACHIN	+		
CONTROL NEGATIVO	-		

Citotoxicidad:

La tabla no. 9 muestra que ninguno de los extractos de lectina que comprende este estudio son tóxicos a la concentración de 200 microgramos de proteína frente a linfocitos de sangre humana tipo A+.

Aglutinación y Citotoxicidad de los Espermatozoides: (tabla 10)

Los extractos de leguminosas frente a espermatozoides sí mostraron efecto aglutinante y citotóxico aunque de manera ligera. La aglutinación de la misma forma que en la tabla no. 8 se midió subjetivamente usando la misma escala, obteniendo el mayor porcentaje de aglutinación con el extracto de Jackbean siguiéndole el Frijol Negro Jamapa y el Frijol del Monte. Los demás no presentaron aglutinación.

Por lo que se refiere a la citotoxicidad, el porcentaje fue muy variado. No habiendo correlación en cada una de las cinco pruebas, como ya ha sido mencionado por otros autores. El Cacahuanano y la Pata de Vaca fueron los que mostraron el porcentaje de citotoxicidad más alto que fue en promedio: 8 - 8.4

Se anexan las gráficas de 1 a 7 para mostrar los resultados de una manera más clara y poder comparar las características estudiadas en cada una de los extractos. Así se puede observar que de las muestras estudiadas la más sobresaliente fue el Jackbean, que dió el título más alto de hemaglutinación con sangre de conejo, la máxima transformación

blastoide, la mayor actividad mitogénica, y la máxima aglutinación con espermatozoides.

TABLA 9
 CITOTOXICIDAD DE CELULAS DE SANGRE HUMANA FRENTE A 200 μ g DE

 EXTRACTO CRUDO DE LECTINA

MUESTRAS		% DE CITOTOXICIDAD *
CONTROL POSITIVO (PHA)		
CONTROL NEGATIVO		
CACAHUANANO		EN NINGUNO
COLORIN		
FRIJOL DEL MONTE		DE LOS
FRIJOL NEGRO JAMAPA		EXTRACTOS SE
JACKBEAN		
LENTEJA		PRESENTO
"NESCAFE"		
PATA DE VACA		CITOTOXICIDAD
TABACHIN		

* NUMERO DE CELULAS TEÑIDAS EN UN TOTAL DE CIEN

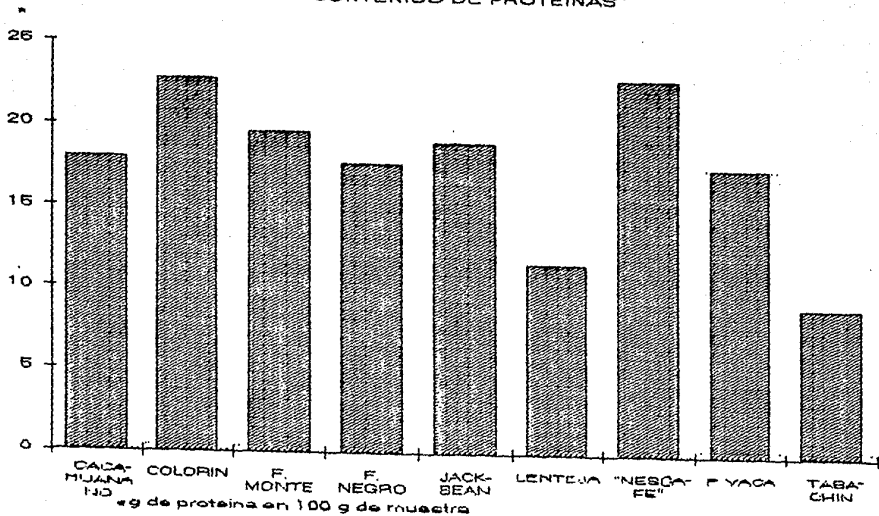
TABLA 10

AGLUTINACION Y CITOTOXICIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES EN PRESENCIA DE LECTINAS *

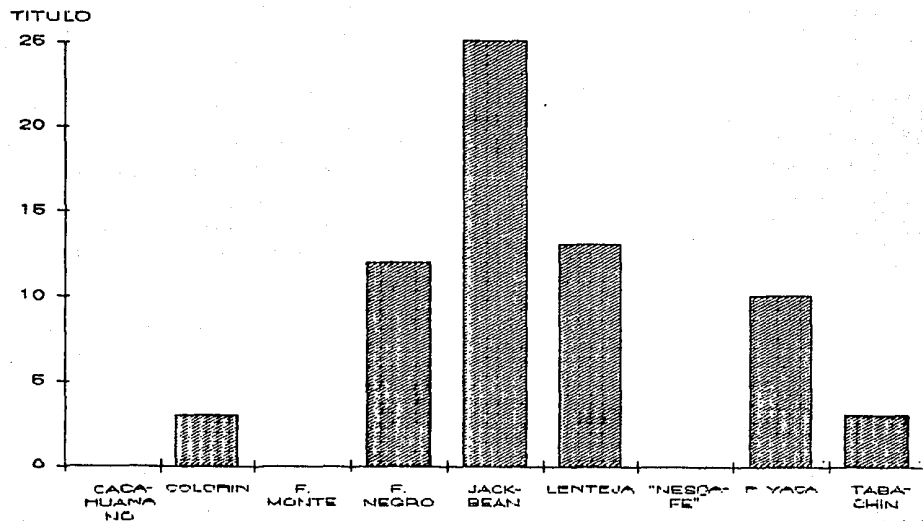
Muestras	A		B		C		D		F	
	CITO-TOXICIDAD	AGLUTINACION	CITO-TOXICIDAD	AGLUTINACION	CITO-TOXICIDAD	AGLUTINACION	CITO-TOXICIDAD	AGLUTINACION	CITO-TOXICIDAD	AGLUTINACION
CADAHUANO	0%	-	10%	-	0%	-	6%	-	0%	-
COLORIN	5%	-	0%	-	6%	-	5%	-	5%	-
FRIJOL DEL MONTE	4%	+	7%	+	4%	+	3%	+	6%	+
FRIJOL N. JAMAICA	2%	++	2%	++	5%	++	6%	++	2%	++
JACARUAN	7%	+++	2%	+++	12%	+++	9%	+++	7%	+++
LENTEJA	7%	-	0%	-	6%	-	7%	-	6%	-
"NESCAFE"	7%	-	11%	-	5%	-	5%	-	0%	-
PATA DE VACA	7%	-	10%	-	10%	-	7%	-	0%	-
TANACHIN	7%	-	11%	-	6%	-	9%	-	5%	-
CONTROL (-) (SIN EXTRACTO CRUDO)	5%	-	7%	-	3%	-	1%	-	6%	-

EN LA CITOTOXICIDAD EL % REPRESENTA EL NUMERO DE CELULAS MUERTAS UTILIZANDO AZUL DE TRIPAN

GRAFICA 1.
CONTENIDO DE PROTEINAS

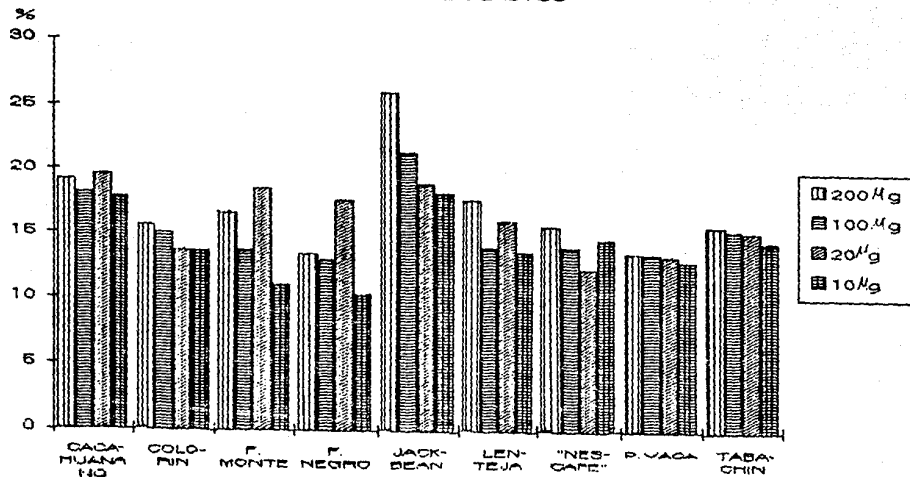


GRAFICA 2
TITULO DE HEMAGLUTININAS EN SANGRE DE CONEJO

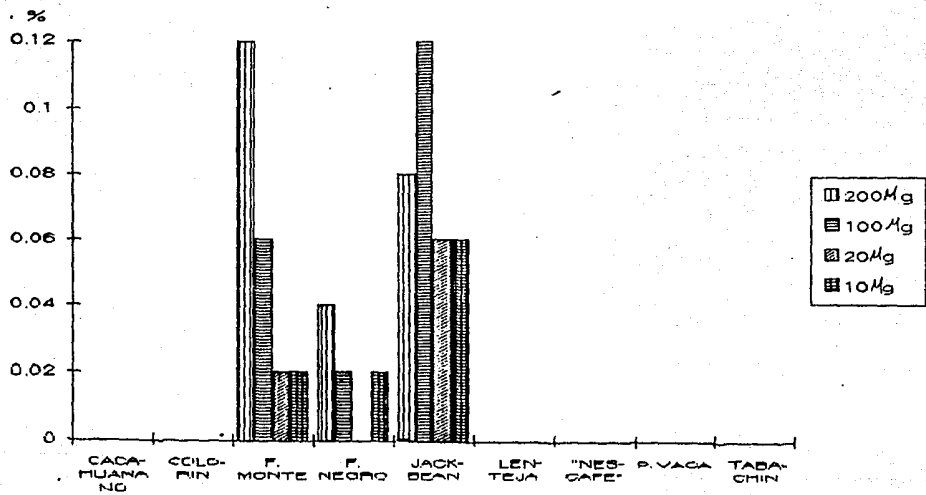


GRAFICA 3.
TRANSFORMACION BLASTOIDE
PORCENTAJE DE BLASTOS

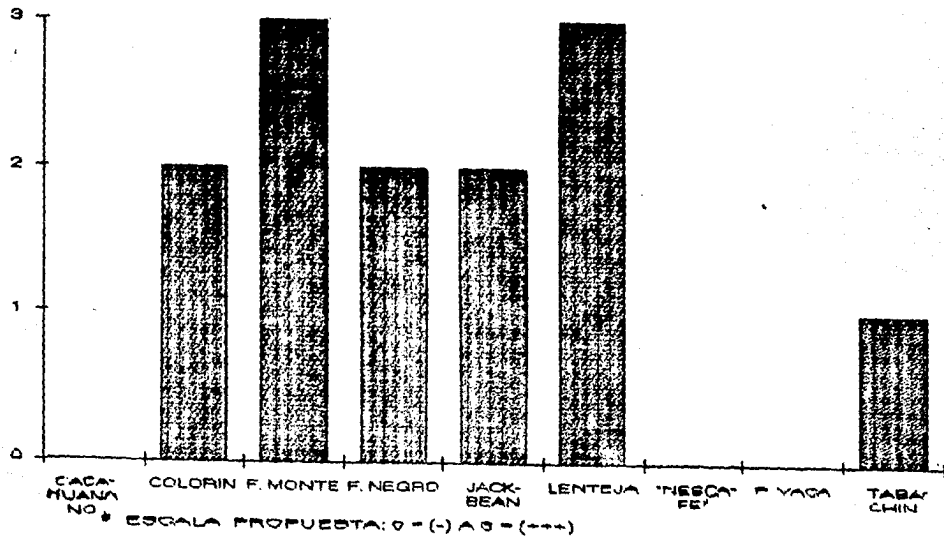
45



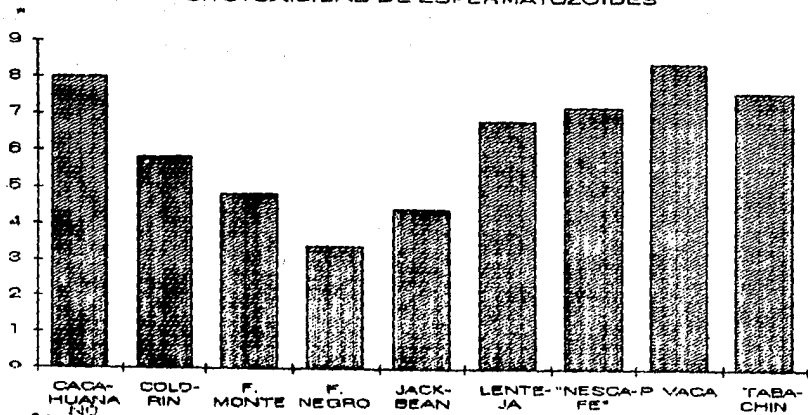
GRAFICA 4.
ACTIVIDAD MITOGENICA
PORCENTAJE DE MITOSIS



GRAFICA 5
HEMAGLUTINACION MICROSCOPICA FRENTE A SANGRE TIPO A+

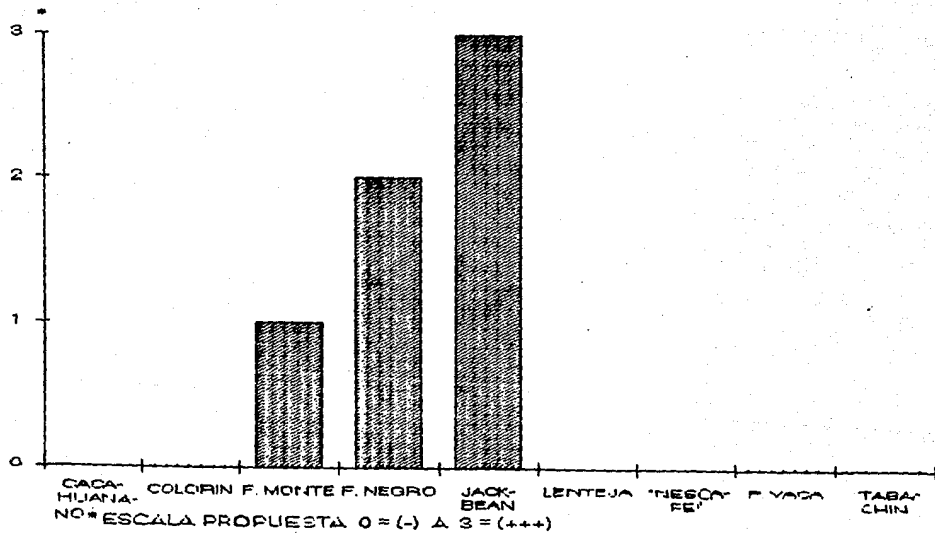


GRAFICA 6
CITOTOXICIDAD DE ESPERMATOZOIDES



* Promedio del % de células muertas. Se hizo por triplicado en 6 muestras

GRAFICA 7
AGLUTINACION DE ESPERMATOZOIDES



CONCLUSIONES

De las muestras estudiadas la que mostró más alto contenido de lectinas fue la *Canavalia ensiformis* (Jackbean) aglutinando eritrocitos de conejo y espermatozoides.

Igualmente, fue esta leguminosa la que presentó mayor actividad mitogénica y transformación blastoide.

En ninguno de los extractos estudiados se observó efecto citotóxico en linfocitos.

Los espermatozoides mostraron mayor sensibilidad observándose muy ligera toxicidad con los extractos de *Gliricidia sepium* (Cacahuanano) y *Bahuinia purpurea* (Pata de Vaca).

Solamente en la *Canavalia ensiformis* con alto contenido de lectinas se pudo encontrar correlación entre la actividad mitogénica así como la transformación blastoide.

Las muestras de *Gliricidia sepium* (Cacahuanano) y *Stizobium cinerium* ('Nescafé') no mostraron presencia de lectinas con sangre de conejo. Sin embargo *Gliricidia sepium* (Cacahuanano) presentó gran porcentaje de transformación blastoide con sangre tipo A+ y no aglutinó a los espermatozoides.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA:

- 1)Ascencio F., Ochoa J.L. "Marine Invertebrate Agglutinins: The Lectin from *Megapitaria squalida* CLAM". Lectins 4, 409-414 (1985).
- 2)Bhattacharyya L. "A Comparative Study on Lectins from four *Erythrina* species". Phytochemistry 25/9/, 2117-2122 (1986).
- 3)Borrebaeck C.A., Roygé P. "Mitogenic Properties of Structurally Related *Lathyrus* Lectins". Archives of Biochemistry and Biophysics 248, 30-34 (1986).
- 4)Bunn M.M., Campos A. "Lectin(s) Extracted from Seeds of *Artocarpus integrifolia* (Jackfruit): Potent and Selective Stimulator(s) of Distinct Human T and B cell Functions". The Journal of Immunology 127/2/, 427-429 (1981).
- 5)Con J. M. "Lectins in Wheat Gluten Proteins". J Agric Food Chem 31/5/, 939-341 (1983).
- 6)Conrath T. B. Handbook of Microtiter Procedures. Dynatech Co, 1-29, Mass. (1972).
- 7)Cook Engineering Company. Microtiter (Intruction Manual). 4a. Edition Alexandria, Virginia (1969).
- 8)De Robertis.
Cell Biology.
6a. Edition.
WB Saunder Company.
USA (1975).
- 9)Dutta B.K. "Purification and Properties of Mitogenic Lectins from Seed of *Lathyrus sativus* Linn". Archives of Biochemistry and Biophysics 201/1/, 137-146 (1980).
- 10)Edelman G.M. Molecular Probes of Spermatozoan Structures'. Proc Nat Acad Sci 68/10/, 2436-2440 (1971).
- 11)Falasca A. "Mitogenic and Haemagglutinating Properties of a Lectin Purified from *Mura crepitans* seeds". Biochemica et Biophysica Acta 632, 95-105 (1980).
- 12)Fiscus S.A. "Mitogen-Induced Blastogenesis of Peripheral Blood and Efferent Lymph Lymphocytes from Sheep". Am J Vet Res 43/4, 629-632 (1982).
- 3)Franz H. "Lectins definition and classification". Acta Histochem 71/1, 19-21 (1982).

- 14) Fudenberg, Hugh H., Stites P.P. Immunología Clínica
3a. edición
El Manual Moderno, S.A. de C. V.-
México, D.F. (1982).
- 15) Hammarström, S., Kabat, E.A. Biochemistry 106, 1684 (1971).
- 16) Hankis C.N. "Legume -Galactosidases Which Have Hemagglutinin Properties". Plant Physiol 65, 618-622 (1980).
- 17) Harborne J. B. Chemotaxonomy of The Leguminosae.
Ed. Academic Press.
New York, USA (1971).
- 18) Hartree E.F. "Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response". Anal Biochem 48, 422-427 (1972).
- 19) Herrera E.M. "The Search for New Lectins Sources on the Baja California Peninsula". Lectins -Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry 2, 693-700 (1982).
- 20) Jaffé G., Brucher O. "Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles". Arch Latinoamer Nutr 22, 267-281 (1972).
- 21) Kama I. "Mitogenic Heparin-Binding Lectin-Like Protein from Cloned Thymic Myoid Cells". Cellular Immunology 103, 183-190 (1986).
- 22) Kimura S., "T cell mitogenicity of a novel -D-Galactoside-Specific Lectin from the Beetle, *Allomyrina dichotoma* (allo A)". Immunopharmacology 13, 181-188 (1987).
- 23) Lichtman A. "Effects of Trifluoroperazine and Mitogenic Lectins on Calcium ATPase Activity and Calcium Transport by Human Lymphocyte Plasma Membrana Vesicles". Journal of Cellular Physiology 111, 213-217 (1982).
- 24) Liener I. Toxic Constituents of Plant Food Stuffs.
Ed. Academic Press.
New York, USA (1969).
- 25) McCoy J.P. "Contemporary Laboratory Applications of Lectins" Bio techniques 4/3/, 252-259 (1986)
- 26) Moorhead P. S. "Chromosome Preparations of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood". Exp Cell Res 20, 613-616 (1960).

- 27) Munske G.R. "A Comparison of the Interactions of the Mitogenic and Nonmitogenic Lima Bean with Human Lymphocytes." The Journal of Immunology 137/10/, 3216-3223 (1986).
- 28) Nicolson G.L., Yanagimachi R. "Terminal Saccarides on Sperm Plasma Membranes Identification by Specific Agglutinins". Science 177, 276-278 (1972).
- 29) Ochoa J. L. "Consideration of the Nature of the Lectin-Carbohydrate Interaction". Journal of Chromatography 215, 351-360 (1981).
- 30) Ochoa J. L. "Resedine: an Albumin-Inhibitable Lectin from *Lawsonia inermis* var. *Reseda*". B.I. Characterization of Lectin 389-386.
- 31) Ochoa J. L. "On the Specificity and Hydrophobicity of Lectins". Lectins-Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry 1, 73-78 (1981).
- 32) Ochoa J. L., Kristiansen T. "Purification and Partial Characterization of an Agglutinin from *Phaseolus coccineus* var. *Alubia*". Biochemica et Biophysica Acta 705, 396-404 (1982).
- 33) Ochoa J.L. "The Mechanisms of Lectin-Mediated Cell Agglutination". Path Biol 27/2/, 103-113 (1979).
- 34) Pandolfino E. R. "A Comparison of the Cell-Binding Characteristics of the Mitogenic and Nonmitogenic Lectins from Lima Beans". The Journal of Biological Chemistry 258/15/, 9203-9207 (1983).
- 35) Pfeifer R., Irons R. D. "Inhibition of Lectins-Stimulated Lymphocyte Agglutination and Mitogenesis by Hydroquinone Reactivity with Intracellular Sulfhydryl Group". Experimental and Molecular Pathology 35, 189-198 (1981).
- 36) Rutigliano V. "Attività Lectinica Della Wheat Germ Agglutinin (WGA) Di *Triticum vulgare* su duodeno di Bambini Normali". Boll Soc It Biol Sper 62/4/ 487-492 (1986).
- 37) Sletten K. "The Primary Structure of the Alpha Chain of a Mitogenic Lectin from the Seeds of *Lathyrus sativus*". Hoppe Seylers Z Physiol Chem 364/8/, 1047-1051 (1983).
- 38) Su L.C. "Lectins Definition and Classification". Acta Histochem 71/11/, 19-21 (1982).
- 39) Tennat Jr. "Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability". Transplantation 2, 685-694.
- 40) Vasta G. R. "Binding and Mitogenic Properties of a Galactosyl-Specific Lectin from the Tunicate *Didemnum candidum*

for Murine Thymocytes and Splenocytes". The Journal of Immunology 137/10/, 3216-3223 (1986).

41)Vodkin L. O., Raikhel V. N. "Soybean Lectin and Related Proteins in Seeds and Roots of Let and Soybean Varieties". Plant Physiol 81, 558-565 (1986).

42)Young L. G. "Lectin Binding Sites on the Plasma Membrane of Epididymal and Ejaculated Chimpanzee Sperm". Gamete Research 14, 75-87 (1986).

43)Zenteno E., Ochoa J. L. "Cacti lectins". Lectins 4, 438-445 (1985)

44)Zenteno E. "The Sugar Specificity of Machaerocereus aruca Isolectins". Lectins 5, 147-153 (1986).

45)Zenteno E., Ochoa J.L. "Aglutininas de Cactáceas, un Nuevo Recurso de Valor Científico y Económico". Ciencia 35, 153-162 (1984).