



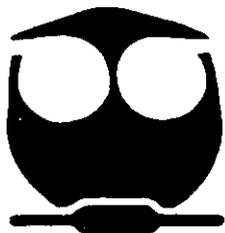
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

73
24
EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DEL EFECTO *IN VITRO* DE LA LECTINA
DE COLEOPTILO DE MAIZ (*ZEA MAYS*), PARA
MODULAR CELULAS MONONUCLEADAS DEL
SISTEMA INMUNE MURINO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GEORGINA CLAUDIA MARTINEZ COPCA



MEXICO, D. F.



1998.

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

265839

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente Prof. Inés Fuentes Noriega.
Vocal Prof. Saturnino De León Chapa.
Secretario Prof. Juan Arcadio Molina Guarneros.
1er. suplente Prof. Ana María Vázquez Alvarez.
2o. suplente Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Farmacología Celular.
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. U.N.A.M.

Apoyado por D.G.A.P.A. - U.N.A.M.
Poyectos IN201095 y IN218398.

Asesor de tema:

M.C. Juan Arcadio Molina Guarneros.



Supervisor técnico:

Q.F.B. María Juana García Mondragón.



Sustentante:

Georgina Claudia Martínez Copca.



**A mi madre
Por su amor**

**A mi hermano
Gracias por estar
siempre a mi lado
apoyandome**

**A mi hermana
Por su paciencia**

**A toda mi familia
Por su enorme cariño**

**A todos mis amigos
Por su ayuda y
amistad**

Agradezco a el M. en C. Juan Arcadio Molina Guarneros y a todo el equipo de trabajo del laboratorio de farmacología celular de la Facultd de Medicina, el haberme permitido formar parte de su grupo y por la confianza que me brindaron.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PAGINA
Abreviaturas	1
Apéndice	
I Material y equipo	1
II Reactivos	2
Introducción	3
Antecedentes	5
Objetivos	13
Hipótesis	13
Material y método	14
Material biológico	14
Ensayo de proliferación celular	14
Estallido respiratorio	15
Reconocimiento de estirpes celulares	16
Ensayo de faloidina-rodamina	17
Resultados	18
Gráfica 1. Proliferación celular de bazo de ratón Balb/c	20
Gráfica 2. Proliferación celular de timo de ratón Balb/c	21
Gráfica 3. Actividad fagocitaria en MPR de ratón Balb/c	22
Gráfica 4. Actividad fagocitaria en MPI de ratón Balb/c	23
Gráfica 5. Actividad fagocitaria en MPI de ratón C57BL/6	24
Fotografías	
Panel I. Timocitos y esplenocitos	25
Panel II. Macrófagos peritoneales	26
Panel III. Macrófagos peritoneales	27
Análisis de resultados	28
Conclusión	30
Bibliografía	31

ABREVIATURAS

DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIC	Contraste Diferencial de Interferencia
D-MEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBSS	Solución balanceada de HANK'S
LCM	Lectina de coleoptilo de maíz
MPI	Macrófagos peritoneales inducidos
MPR	Macrófagos peritoneales residentes
MTT	Metiltetrazolio (3-(4,5 - dimetil-tiazol-2-il)-bromuro 2,5 difeniltetrazolio)
NBT	Azul de tetrazolio (2,2'-Di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoxo- 4,4' difenilen)
PBS	Amortiguador de fosfatos salina (pH7.2)
TRITC	Isotiocianato de tetrametil rodamina

APENDICE I (material y equipo)

Centrífuga International Equipment Company IEC-Centra 8R.

Hematocitómetro Reichert Scientific Instruments.

Lector de microplacas Biotek EL312.

Microplacas estériles para cultivo Delta/Nunc.

Microscopio Nikon ECLIPSE E600 de triple banda (fluoresceína, rodamina, DAPI).

Equipo de microfotografía Nikon H-III microflex.

Rollo fotográfico KODAK Multi Speed (ASA 100-1000).

Programa de computo Sigma Plot V. 3.0 y Sigma Stat V. 2.0 (Jandel Scientific), para Windows 95.

APENDICE II (reactivos)

Medio tioglicolato BIOXON.

La solución balanceada de HANK'S, el medio D-MEM, α -lactosa, MTT, NBT y la faloidina-TRITC se obtuvieron en Sigma Chemical Co.

Suero fetal bovino fue obtenido en Gibco-BRL.

La penicilina y la estreptomycinina se compraron en Lakeside.

INTRODUCCION

Las lectinas constituyen un grupo muy heterogéneo de proteínas que pueden estar glicosiladas, hasta el momento sólo ha sido posible clasificarlas en base a la taxonomía de las especies de las que provienen. Básicamente este grupo de proteínas comparten solo una propiedad, la cual es su habilidad para reconocer y ligar en forma específica y reversible carbohidratos solos o en glicoconjugados.

Recientemente Córdoba y colaboradores obtuvieron en forma pura una glicoproteína de coleoptilo de maíz, la cual mostró actividad hemaglutinante y esta actividad fué inhibida por azúcares específicos, a esta glicoproteína se le nombró lectina de coleoptilo de maíz (*Zea mays*).

Las lectinas muestran *in vitro* actividades moduladoras en células del sistema inmune humano y murino, debido a que se desconoce si esta lectina presente dichas actividades se llevó a cabo una caracterización preliminar de sus efectos *in vitro* en células del sistema inmune murino.

Las células se obtuvieron de ratones singénicos de las cepas C57BL/6 y Balb/c : 1) Se investigó el efecto mitógeno de la lectina de coleoptilo de maíz en células de timo y bazo mediante la reducción del metiltetrazolio utilizando como controles positivos Concanavalina-A y Fitohemaglutinina; 2) Se estudió el efecto de la lectina en la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes e inducidos mediante la reducción de azul de tetrazolio; 3) Se estudió el reconocimiento de estas células del sistema inmune, utilizando como ligando la lectina de coleoptilo de maíz marcada con isotiocianato de fluoresceína, mediante microscopía de epifluorescencia.

No observamos actividad mitogénica en los timocitos o esplenocitos al ser tratados con varias concentraciones de la lectina de coleoptilo de maíz.

Observamos un incremento de la actividad fagocitaria de 114% en macrófagos peritoneales inducidos de la cepa C57BL/6, expuestos durante 24 horas a concentraciones en el intervalo de 0.08 a 2.5 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ y un incremento del 62.5% en el caso de de los macrófagos peritoneales inducidos de la cepa Balb/c expuestos durante 24 horas a concentraciones en el intervalo entre 0.16 a 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$.

La lectina de coleoptilo de maíz fluoresceinada marca positivamente al 100% de los macrófagos peritoneales inducidos, no marca a macrófagos peritoneales residentes y marca solamente el 1.7% de células de timo o bazo.

Estos resultados muestran que la lectina de coleoptilo de maíz identifica principalmente a los macrófagos peritoneales inducidos y en cantidades mínimas a otras estirpes celulares, por lo que podría utilizarse como una herramienta para identificar estirpes celulares.

ANTECEDENTES

Históricamente, inmunidad significa protección contra enfermedades, y más específicamente enfermedades infecciosas. Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, y su respuesta colectiva y coordinada en contra de una sustancia reconocida como extraña es la respuesta inmune (1). Cualquier respuesta inmune requiere, primero del reconocimiento y después del inicio de una reacción en contra de la sustancia reconocida como extraña, con la finalidad de eliminarla. La eficiencia del sistema inmune tiene como finalidad proveer de protección al organismo, y esto depende de la interacción de muchos componentes celulares y humorales.

Algunas de las células que participan en la respuesta inmune son: células B, células T, linfocitos gigantes, células asesinas naturales (NK), fagocitos mononucleares, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), células cebadas, plaquetas, células endoteliales, células dendríticas, etc. Los leucocitos son centrales en toda respuesta inmune, aunque también otras células participan, ya sea señalizando o respondiendo a la citocinas liberadas por linfocitos T y macrófagos.

La generación de la respuesta inmune depende de un conjunto complejo de interacciones ya sea célula-célula o a través de señales solubles, entre células del sistema inmune y con otras células del mismo organismo (2).

Así mismo, las interacciones célula-célula son necesarias en muchos otros procesos biológicos tales como fertilización, embriogénesis, migración celular, formación de órganos, respuesta inmune e infecciones microbiológicas.

El primer paso de muchos procesos basados en las interacciones célula-célula es el reconocimiento, evento central en una gran variedad de fenómenos biológicos. El reconocimiento se da entre células y de éstas con su

microentorno, se lleva a cabo a través de receptores y ligandos.

La especificidad de un ligando con su receptor conforma la base de regulación de las interacciones de reconocimiento (3).

Aunque la naturaleza de las moléculas involucradas en el reconocimiento celular aún no ha sido elucidada del todo (3), se sabe que en la superficie membranal de todas las células existen proteínas simples y glicoconjugados (glicolípidos, glicoproteínas y proteoglicanos), siendo la región glicosídica la más externa de las moléculas, lo cual facilitaría la interacción entre estas moléculas, por lo que se piensa que estas regiones glicosídicas tienen un papel relevante en el reconocimiento celular.

Hasta hace poco tiempo, sólo se conocía la interacción proteína-proteína, mas recientemente se ha comenzado a considerar la importancia de las interacciones entre las cadenas glicosídicas y sus receptores (4). Un hecho notable es que se pueden formar una mayor gama de estructuras glicosídicas que de estructuras proteicas, en virtud de que los carbohidratos pueden formar arreglos lineares así como ramificados (5). Pueden presentarse en la configuración anomérica (α o β), y sufrir modificaciones particulares como fosforilación o sulfatación. Esto hace a los carbohidratos particularmente adecuados para desempeñar funciones de reconocimiento y de bioseñalización, debido a la gran cantidad de información que pueden contener en su estructura (4).

Dentro de las múltiples funciones fisiológicas de los carbohidratos, que conforman a los glicoconjugados, se les ha atribuido un papel muy importante como comunicadores intercelulares y con su microentorno, gracias a lo cual pueden llevar a cabo varias funciones tales como el crecimiento, maduración, diferenciación, algunos procesos de malignidad y en la respuesta inmune (6), por ejemplo en el caso de los leucocitos estas estructuras glicosídicas le permiten interactuar con las células endoteliales, por mecanismos de adherencia

heterotípica, estos procesos son primordiales para el proceso de "homing" y para su movilización a los sitios de infección y lesión (7).

Este proceso de "homing" o movilización, se efectúa gracias a la interacción específica de moléculas de adhesión pertenecientes a diversas familias de glicoproteínas de superficie celular, entre las que se considera a las denominadas selectinas, integrinas, moléculas de adhesión a cartilago y moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (8).

La importancia cada vez mayor de los carbohidratos en el reconocimiento celular ha llevado a poner mayor atención en su funcionamiento y regulación, por tanto existe un gran interés en todas aquellas moléculas que puedan ser utilizadas como herramientas que permitan tener un mayor conocimiento de este sistema, entre estas moléculas se encuentran las lectinas.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas las cuales presentan un dominio que reconoce y se une en forma reversible a monosacáridos (por ejemplo: manosa, glucosa, galactosa, fucosa, xilosa, N-Acetilglucosamina, N-Acetilgalactosamina, etc.), oligosacáridos o polisacáridos. La especificidad de una lectina es definida en términos de su inhibición de la hemaglutinación de eritrocitos humanos o animales (caballo, borrego, gallina, conejo, etc.) , por oligosacáridos o monosacáridos simples, aunque en algunos casos son necesarios polisacáridos (9).

TABLA I.

PROPIEDADES QUIMICAS Y BIOLÓGICAS DE ALGUNAS LECTINAS (10).

Lectinas.	Subunidades.	Especificidad Grupo Sanguíneo	Carbohidrato específico que reconoce.	Actividad Mitogénica.
Concava- valina A	4	-	α -man, α -glc	+
<i>Arachys hypogaea</i>	1	-	gal	+
<i>Lens culinaris</i>	2	-	α -man	+
<i>Lotus tetragonolobus</i>	1	O	fucosa	-
<i>Phaseolus lunatus</i>	4	A ₁	N-Acgal	+
<i>Sophora japonica</i>	4	A,B	β -N-Acgal	-
<i>Triticum vulgaris</i>	2	-	N-Acglc	+

Desde su descubrimiento por Hermann Stillmark en 1888, las lectinas (del latín *legere*, que significa escoger o seleccionar) (11), han sido objeto de una amplia investigación interdisciplinaria, en parte por la relativa facilidad con la que pueden ser aisladas por cromatografía de afinidad con carbohidratos o glicoproteínas inmovilizados en una fase sólida (12,13).

Se han estudiado por más de 100 años e identificado en plantas (semillas, frutas, raíces, tallos), parásitos, bacterias, hongo, caracoles (en hemolinfa), en

peces y otros vertebrados (14) etc.; sin embargo las mas estudiadas son las de origen vegetal, debido a su amplia distribución (15). En contraste de las pequeñas cantidades de lectinas que hay en tejido de vegetales, (aproximadamente no mas de 0.05% de la proteína soluble del tejido del cual se extraen), se encuentran en grandes cantidades en semillas y órganos de almacenaje (16,17). Hasta el momento parece ser que se encuentran en forma más abundante en plantas de la familia *Leguminosae* (18).

A pesar de su amplia distribución en la naturaleza sus funciones fisiológicas no han sido completamente entendidas aún, sin embargo se ha especulado sobre su posible papel.

TABLA II .
POSIBLES FUNCIONES DE LAS LECTINAS EN LA NATURALEZA.

Plantas	<ul style="list-style-type: none"> -Unión a bacterias fijadoras de nitrógeno en las leguminosas (19). -Contribuyen a la defensa del huésped en contra de patógenos bacterianos, virales, insectos y fúngicos (18,20).
Animales	<ul style="list-style-type: none"> -Endocitosis y translocación intracelular de glicoproteínas. -Regulación de la migración y adhesión celular. -Reconocimiento de determinantes en la fagocitosis no inmune (21).
Microorganismos	<ul style="list-style-type: none"> -Unión de bacterias y parásitos (ejemplos: amoeba (22), y <i>Plasmodium</i> (23) a las células huésped.

Las lectinas son herramientas muy importantes en la investigación biomédica, por ejemplo: tipificación de grupos sanguíneos (24), en estudios *in vitro* como mitógenos (25), en la caracterización de glicoconjugados (24,26), en la identificación y localización de estirpes celulares (27), en procesos de diferenciación (28) y en estudios histoquímicos de tejidos sanos y enfermos.

Aunque gran parte del interés que se tuvo en un principio sobre estas moléculas se debía a sus propiedades para ligar carbohidratos, se ha comenzado a prestar atención a otros aspectos como lo es su bioquímica, biología celular, función fisiológica, genética, quimiotaxonomía, efectos en el sistema inmune, etc. (29).

Al descubrirse que la distribución de las lectinas en la naturaleza no se restringía solo a las plantas, sino que es ubicua, además de su importancia como herramientas en la investigación, comenzó a desarrollarse un mayor interés en el papel que posiblemente desempeñen en los organismos, como moléculas de reconocimiento intercelular (30).

Las lectinas constituyen un grupo muy heterogéneo de (glico)proteínas, hasta el momento sólo ha sido posible clasificarlas en base a la taxonomía de las especies de las que provienen. Aunque dentro de estos grupos presentan cierto grado de homología en su secuencia de aminoácidos y nucleótidos, e incluso algunas secuencias son invariantes o muy conservadas, difieren unas de otras en su estructura y especificidad, y por el contrario lectinas que difieren en su origen y poseen estructuras moleculares completamente diferentes exhiben especificidades muy similares (31). Básicamente este grupo de proteínas comparte solo una propiedad, la cual es su habilidad para reconocer y ligar en forma específica y reversible carbohidratos solos o en glicoconjugados.

Se sabe que la interacción específica de lectinas con glicoligandos de la membrana citoplasmática de células del sistema inmune modula varios aspectos funcionales de este sistema (32). En base a que es conocido que estas (glico)proteínas tienen diversas actividades en el sistema inmune y ya que nuestro grupo de trabajo logró obtener en forma pura la lectina de coleoptilo de maíz es importante investigar que tipo de actividades presenta en el sistema inmune.

La caracterización de lectinas en maíz fue iniciada por el grupo de Lepekhin y cols. (33), y en semillas de maíz por Jankovic y cols. (34), en México, este trabajo ha sido estudiado por Córdoba y cols., quienes han trabajado en una lectina de coleoptilo de maíz (37).

El maíz pertenece a la familia *Gramineae*, la cual incluye cereales como trigo, avena, cebada, sorgo y arroz. El maíz es clasificado en la subfamilia *Panicoideae* y clase *Tripsaccae* la cual comprende cuatro géneros: (1) *Euchlaena* (teosinte), (2) *Zea* (maize), (3) *Tripsacum*, y (4) (a)*Coix*, (b)*Sclerachne*, (c)*Polytoxa*, (d)*Chionachne*, (e)*Trilobachne* las cuales son consideradas como un sólo género. El género *Zea* tiene una sola especie la cual es *mays* (35).

El maíz aparentemente es originario de México y se esparció hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta Argentina. El resto arqueológico de maíz más antiguo es de 7000 años y fue encontrado en el valle de Tehuacán en México. Existen numerosas teorías acerca del origen del maíz, aunque solamente dos han recibido una seria consideración. Una propone el teosinte como el progenitor del maíz, y la otra propone a un tipo silvestre de maíz " pod corn", ahora ya extinto.

El maíz es una planta anual, es alta, constituida por raíces, tallo, con una sola hoja en cada nódulo, hojas en dos filas opuestas, y espigas.

Cada hoja consiste de una vaina que rodea el tallo y una hoja en forma de lámina expandida conectada a la vaina por una unión (collar). El maíz es una planta de polinización cruzada, pero tiene sus órganos reproductores femenino y masculino localizados en la misma planta.

La semilla del maíz es un solo fruto llamado kernel. Este incluye un embrión, endosperma, aleurona y pericarpo. El pericarpo es la cubierta de la semilla, es la pared del ovario transformada, la cual cubre al kernel y provee protección para las partes internas. El tejido de la aleurona es una capa sencilla de células acomodadas por debajo del pericarpo. El endosperma conforma la mayor del peso del kernel y esta conformado principalmente por almidón. El embrión es en realidad una planta joven de maíz la cual bajo ciertas condiciones exteriores de temperatura y humedad se activa e inicia su crecimiento. El coleoptilo es una vaina protectora de las hojas jóvenes mientras el kernel se encuentra germinando (36).

Se ha encontrado que la lectina de coleoptilo de maíz es una glicoproteína y tiene actividad hemoaglutinante dirigida hacia eritrocitos humanos de los grupos sanguíneos A, B, y O, y hacia eritrocitos de animales, entre ellos: caballo, borrego, cabra, gallina, conejo, perro y vaca (37). Los carbohidratos naturales por los cuales la lectina de coleoptilo de maíz presenta mayor afinidad son: lactosa, D-galactosa y D-glucosa, en ese orden (38), aunque también tiene afinidad por la rafinosa y la lactulosa (37). La composición de carbohidratos de la lectina de coleoptilo de maíz es la siguiente: Xylosa 124 nmol, manosa 163.677nmol, galactosa 429.721nmol, glucosa 343.792 nmol, por mg de muestra. El total de carbhidratos corresponde al 18.758% del peso de la muestra, (comunicación personal con F. Córdoba).

OBJETIVO GENERAL

Investigar y caracterizar las actividades biológicas de la lectina de coleoptilo de maíz (*Zea mays*) en células del sistema inmune murino (timocitos, esplenocitos y macrófagos peritoneales).

OBJETIVOS PARTICULARES

- (I) Determinar y caracterizar si la lectina de coleoptilo de maíz (LCM) induce actividad mitogénica en células T y B del sistema inmune murino.
- (II) Determinar y caracterizar si la LCM induce algún cambio en el estallido respiratorio en macrófagos murinos inducidos de exudado peritoneal.
- (III) Determinar si la LCM reconoce alguna(s) de las estirpes celulares estudiadas.

HIPOTESIS

La lectina de maíz al igual que otras lectinas induce cambios en algunos de los procesos que llevan a cabo las células del sistema inmune murino.

OBJETIVO GENERAL

Investigar y caracterizar las actividades biológicas de la lectina de coleoptilo de maíz (*Zea mays*) en células del sistema inmune murino (timocitos, esplenocitos y macrófagos peritoneales).

OBJETIVOS PARTICULARES

- (I) Determinar y caracterizar si la lectina de coleoptilo de maíz (LCM) induce actividad mitogénica en células T y B del sistema inmune murino.
- (II) Determinar y caracterizar si la LCM induce algún cambio en el estallido respiratorio en macrófagos murinos inducidos de exudado peritoneal.
- (III) Determinar si la LCM reconoce alguna(s) de las estirpes celulares estudiadas.

HIPOTESIS

La lectina de maíz al igual que otras lectinas induce cambios en algunos de los procesos que llevan a cabo las células del sistema inmune murino.

MATERIAL Y METODO

Material biológico

Se utilizaron ratones machos de 12 semanas de edad de las cepas Balb/c y C57BL/6, con un peso aproximado de 25 g para la obtención de esplenocitos y macrófagos de exudado peritoneal; los timocitos se obtuvieron de ratones machos de 3 semanas de edad de las mismas cepas, con un peso aproximado de 6 g.

Lectinas

El aislamiento de la lectina de coleoptilo de maíz fue realizado por el grupo de trabajo del laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Inmunología y Bioquímica del ITO. La purificación se llevó a cabo utilizando cromatografía de afinidad en columnas de lactosa/agarosa, basándose en la actividad ligante de la lectina (37).

La lectina de coleoptilo de maíz fué fluoresceinada por el grupo de trabajo del laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Inmunología y Bioquímica del ITO.

Las lectinas, Concanavalina-A y Fitohemaglutinina, utilizadas en los ensayos fueron obtenidas de Sigma Chemical Co.

I Ensayo de proliferación celular

Para la obtención de las células, se extrajo el órgano (timo y/o bazo) en forma aséptica y se tamizó con la ayuda de un cedazo y gendarme, y solución balanceada de HANK'S. Cuando fue necesario, los glóbulos rojos se lisaron con 2ml de amortiguador de lisis pH 7.2 (NH_4Cl 0.135 M -Tris 0.013 M) agitando durante 2 min., después de este tiempo se adicionó 7 ml de solución balanceada de HANK'S y se centrifugó 10 min a 1200 r.p.m., esta operación se repitió dos o tres veces según fué necesario, se hizo un último lavado con solución balanceada de HANK'S, y las células se resuspendieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino , 10U de penicilina/ml y

10µg de estreptomicina/ml. La viabilidad de las células fué evaluada con azul de trypan en hematocitómetro, observandose teñidas en azul las células muertas y sin teñir las células vivas, debido a que sólo las células vivas excluyen el colorante (39).

Las células de timo o bazo se sembraron en microplacas (2×10^5 células/pozo). Se expusieron las células a LCM en el rango de concentración de 0.6 a 5 µg/pozo, de 0 a 96 horas. El número celular se evaluó cada 24 horas mediante la exposición adicional (4h) a metiltetrazolio (MTT) 100 µg/pozo.

Los controles positivos utilizados fueron Concanavalina-A y Fitohemaglutinina en el mismo intervalo de concentraciones. Posteriormente se extrajo el colorante reducido con dimetilsulfóxido y se leyó en un lector de microplacas a una longitud de 570 nm contra un filtro de referencia 405 nm. La cantidad de color desarrollado fué directamente proporcional al número de células viables presentes. La determinación se basa en la reducción de la sal de metiltetrazolio a formazán de metiltetrazolio, por la actividad de una deshidrogenasa mitocondrial (40).

II Estallido respiratorio

Se trabajó con macrófagos peritoneales de ratones inducidos y no inducidos. Los ratones fueron inducidos con 3 ml de medio tioglicolato al 1%, vía intraperitoneal. A las 72 horas se extrajeron asépticamente los macrófagos de la cavidad peritoneal con solución balanceada de HANK'S. Una vez extraídos los macrófagos se lavaron exhaustivamente y se evaluó la viabilidad mediante la exclusión con azul trypan (40). Las células se sembraron en microplacas (2×10^5 células/pozo) y fueron expuestas durante 24 horas a la LCM en el rango de concentraciones 0.6 a 5 µg/pozo o a la LCM incubada previamente durante 30 min. con α - lactosa 0.015M. Al término de este período, se desechó el medio y se sustituyó por 100 µl de zymosan-A acoplado con azul de tetrazolio (NBT) disuelto en PBS 1 mg/ml, previamente incubado 1.5 horas en baño María a

37°C; y se continuó la incubación de las células durante 60 min a 37 °C en una incubadora con 5% de CO₂. Posteriormente se retiró esta mezcla, se lavaron las células varias veces con metanol al 70% y se dejó secar al aire. Enseguida se agregaron 120 µl de hidróxido de potasio 2M y se dejó incubando en agitación durante 2 h, al término de este período se agregaron 140 µl de dimetilsulfóxido y nuevamente se agitaron las placas. Se leyó en un lector de microplacas a una longitud de 630 nm contra un filtro de referencia de 405 nm. La determinación se basa en la reducción del azul de tetrazolio a formazán de tetrazolio por una enzima mitocondrial (41). Las absorbancias se graficaron utilizando programas de computo y las comparaciones estadísticas se hicieron empleando otro programa de computo, aplicando las pruebas apropiadas para cada uno.

III Reconocimiento de estirpes celulares

Para el ensayo de reconocimiento de estirpes celulares, los macrófagos se obtuvieron como se indica en el ensayo de estallido respiratorio, cuando los macrófagos se encontraban suspendidos en medio de cultivo D-MEM (suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10U de penicilina/ml, y 10µg de estreptomycin/ml), se colocaron cubreobjetos en los cultivo celulares, los cuales se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂ durante 6 h para que por adherencia se obtuvieran los frotis.

Transcurrido el tiempo de incubación los cubreobjetos que tenían adheridos los macrófagos se secaron al aire y fueron fijados con metanol absoluto durante 10 min.

Las células de bazo y timo se obtuvieron como se indicó anteriormente, se hicieron frotis y fueron fijados con metanol absoluto durante 10 min.

Los frotis se incubaron con 25 µl de lectina de coleoptilo de maíz-FITC 1:2 en PBS durante 1 h en una cámara húmeda a 37 °C, al finalizar este período se lavaron los frotis 5 veces con PBS y se hicieron observaciones en microscopía

de contraste diferencial de interferencia (DIC) y epifluorescencia, para cada una de las estirpes celulares estudiadas, se tomaron microfotografías (42). Las muestras fueron excitadas a una longitud de onda de 450 a 490 nm y la emisión es de 520 a 560 nm.

IV Ensayo de Faloidina-rodamina

Se incubaron frotis de todas las estirpes celulares con faloidina-rodamina como control positivo de epifluorescencia (la faloidina reconoce a la lectina polimerizada). Los frotis se prepararon igual que para el ensayo de reconocimiento de estirpes celulares. Posteriormente éstos se incubaron con faloidina-TRITC 1:80 en amortiguador (Tris-HCl 25 mM, Glucosa 5 mM, MgCl₂ 0.6 mM, NaCl 137mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0.025 mM) durante una hora en cámara húmeda a 37 °C, después de la incubación se lavaron cinco veces con el mismo amortiguador (43). Las observaciones se hicieron en microscopía de contraste diferencial de interferencia (DIC) y epifluorescencia; se tomaron microfotografías.

Las muestras fueron excitadas en el rango de 543nm a 580 y la emisión es de 553 a 620 nm.

RESULTADOS

I Efecto de la lectina de coleoptilo de maíz en la proliferación celular.

La lectina de coleoptilo de maíz purificada no muestra ningún efecto mitógeno *in vitro* en preparaciones celulares de esplenocitos o de timocitos murinos (figura 1 y 2, respectivamente), comparada con dos lectinas (Concanavalina-A y Fitoheماغlutinina) que si lo muestran.

II Efecto de la lectina de coleoptilo de maíz sobre la actividad fagocitaria.

La lectina de coleoptilo de maíz no tiene efecto estimulante sobre la actividad fagocitaria de macrófagos peritoneales residentes a las concentraciones estudiadas (0.6 a 5.0 $\mu\text{g}/\text{pozo}$; figura 3), sin embargo los resultados muestran que la lectina de coleoptilo de maíz purificada incrementó la actividad fagocitaria de macrófagos inducidos de exudado peritoneal murinos en dos cepas singénicas, incubadas durante 24 horas: en ratones Balb/c hasta en un 62.5% ($p < 0.05$) a las concentraciones utilizadas (0.16 a 10 $\mu\text{g}/\text{pozo}$; figura 4); y en la cepa C57BL/6 (figura 5) un 114% a las concentraciones de 0.04 a 2.5 $\mu\text{g}/\text{pozo}$. Este efecto estimulante es inhibido por la incubación previa de la lectina purificada con lactosa 15 mM (figura 5).

Al comparar el efecto producido por la lectina de coleoptilo de maíz sobre los macrófagos murinos estimulados de las dos cepas , se observa que la respuesta de las células murinas de la cepa C57BL/6 es mayor.

III Unión del conjugado lectina-fluoresceína a diferentes estirpes celulares.

Panel I: Mediante microscopía de epifluorescencia observamos que la lectina de coleoptilo de maíz reconoce aproximadamente al 1.7% de timocitos (fotografía D) y esplenocitos (fotografía H). Se utilizó como un control positivo el marcaje con faloidina-rodamina de timocitos (fotografía B) y de esplenocitos (fotografía F).

Panel II: se observó que la lectina de coleoptilo de maíz se une a todas las células que conforman la población de macrófagos peritoneales murinos inducidos por tioglicolato (fotografía F, 400X y fotografía H, 1000X), a diferencia de los macrófagos peritoneales residentes a los que no se une como se puede observar en la fotografía B. Se utilizó como un control positivo de la epifluorescencia el marcaje de la actina polimerizada mediante faloidina-rodamina (fotografía D).

En las fotografías del panel III utilizamos doble marca (lectina-FITC y faloidinina-TRITC). En la fotografía B se observa la doble marca en sólo tres macrófagos peritoneales inducidos ya que sólo a las células que se les unió gran cantidad de lectina de coleoptilo de maíz se observan teñidas, en estas la marca por la lectina de coleoptilo de maíz es intensa. En el resto de las células no se observa la tinción por la lectina ya que se encuentran teñidos por la faloidina-rodamina que reconoce a la actina polimerizada y ésta es muy abundante en la células. Este fenómeno se observa con mayor claridad en la fotografía D.

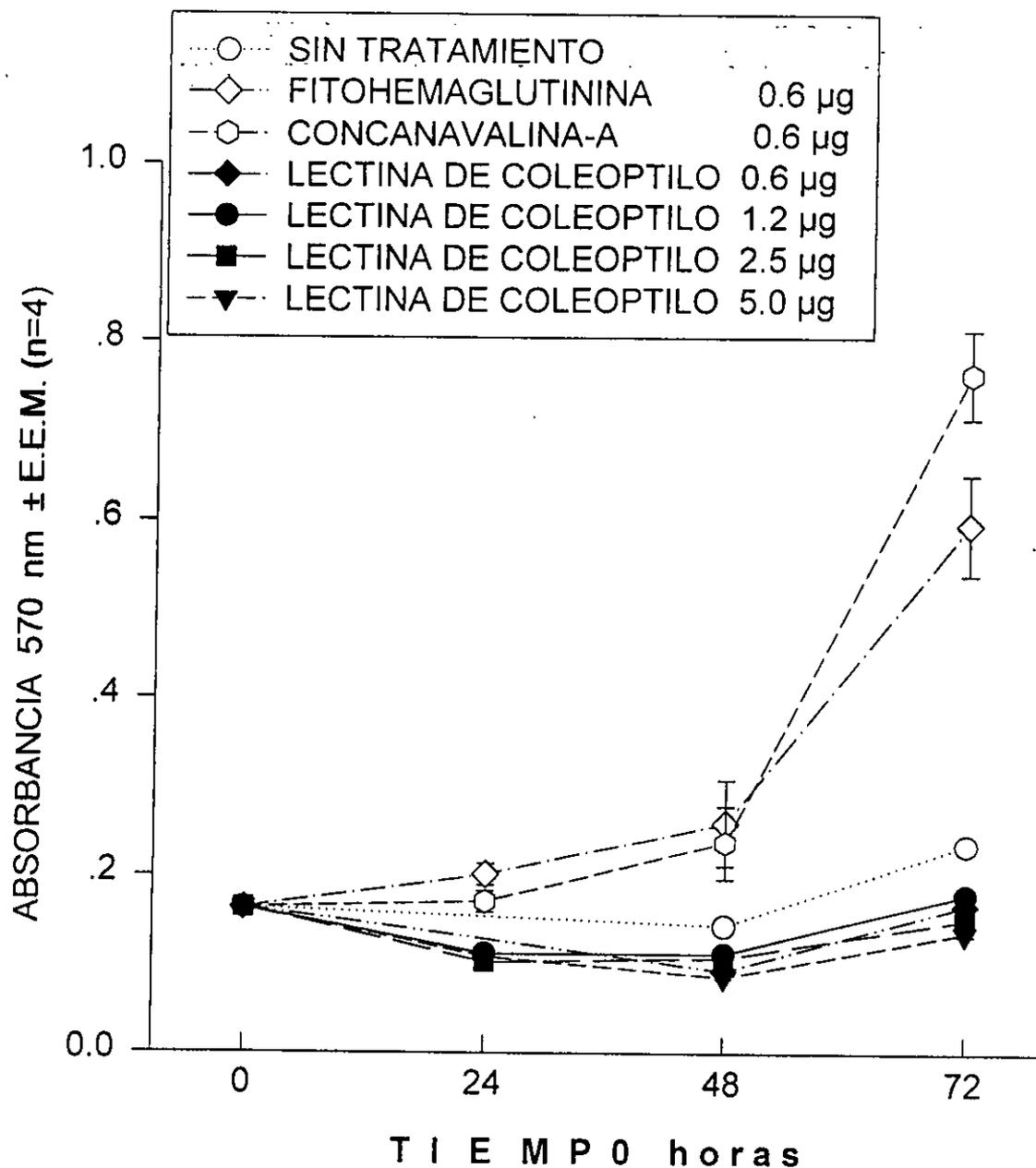


FIGURA 1

**EFFECTO EN LA PROLIFERACION
DE CELULAS DE BAZO DE RATON Balb/c
CON LA EXPOSICION *IN VITRO*
A TRES LECTINAS VEGETALES
EVALUADO MEDIANTE LA REDUCCION DE MTT**

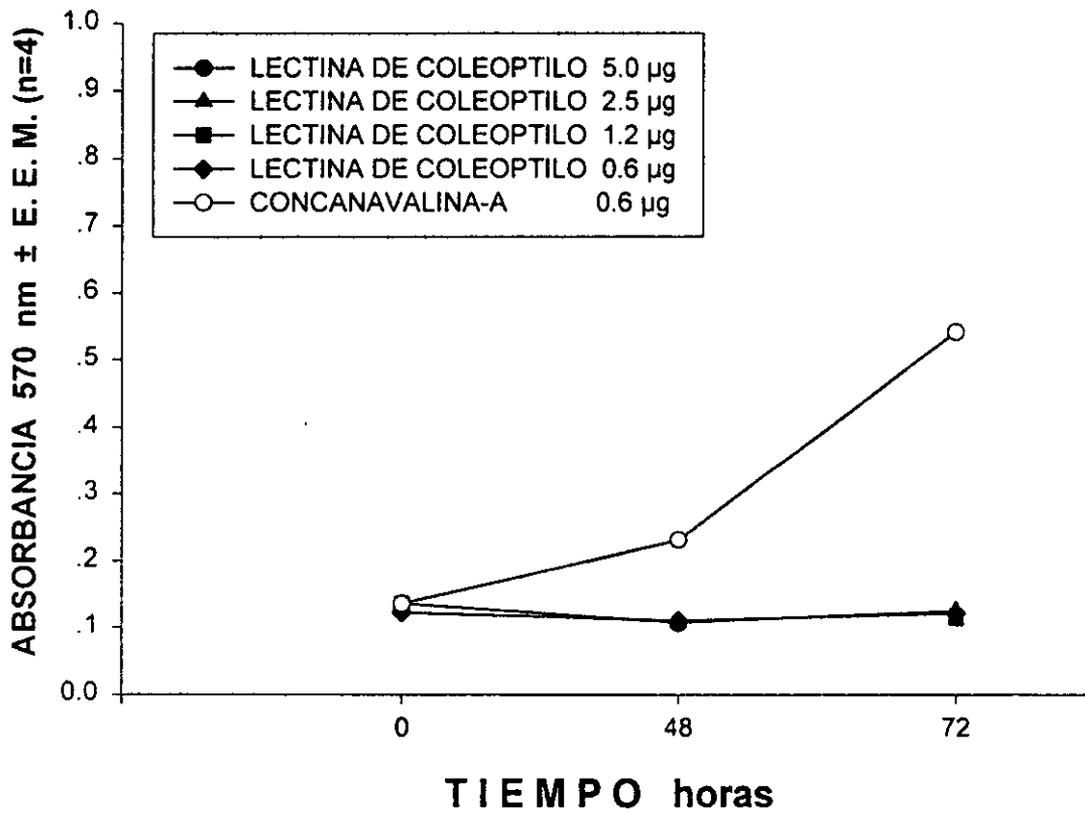


FIGURA 2

**EFFECTO DE DOS LECTINAS VEGETALES
EN LA PROLIFERACION DE CELULAS DE TIMO
DE RATON Balb/c EVALUADO MEDIANTE LA
REDUCCION DE METILTETRAZOLIO**

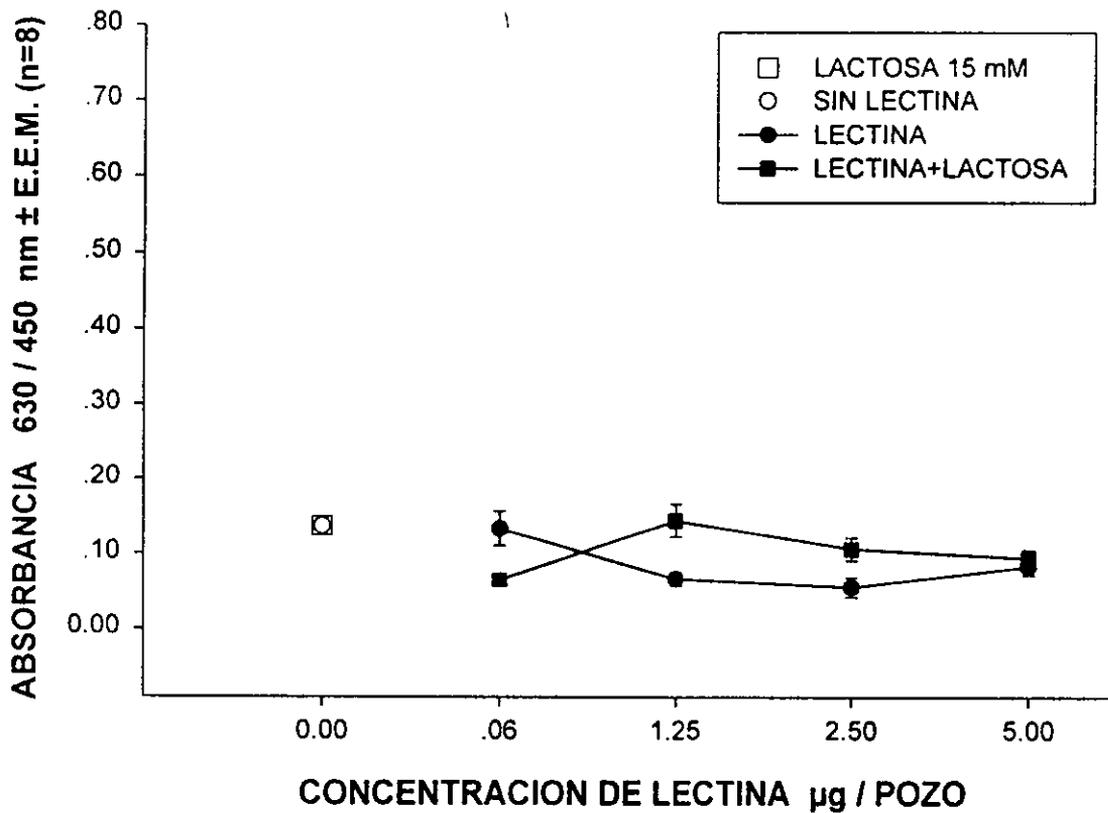


FIGURA 3

EFFECTO DE LA LECTINA de coleoptilo de *Zea mays* (EXPOSICION 24h) EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS PERITONEALES RESIDENTES DE RATON Balb/c EVALUADO MEDIANTE REDUCCION DE NBT

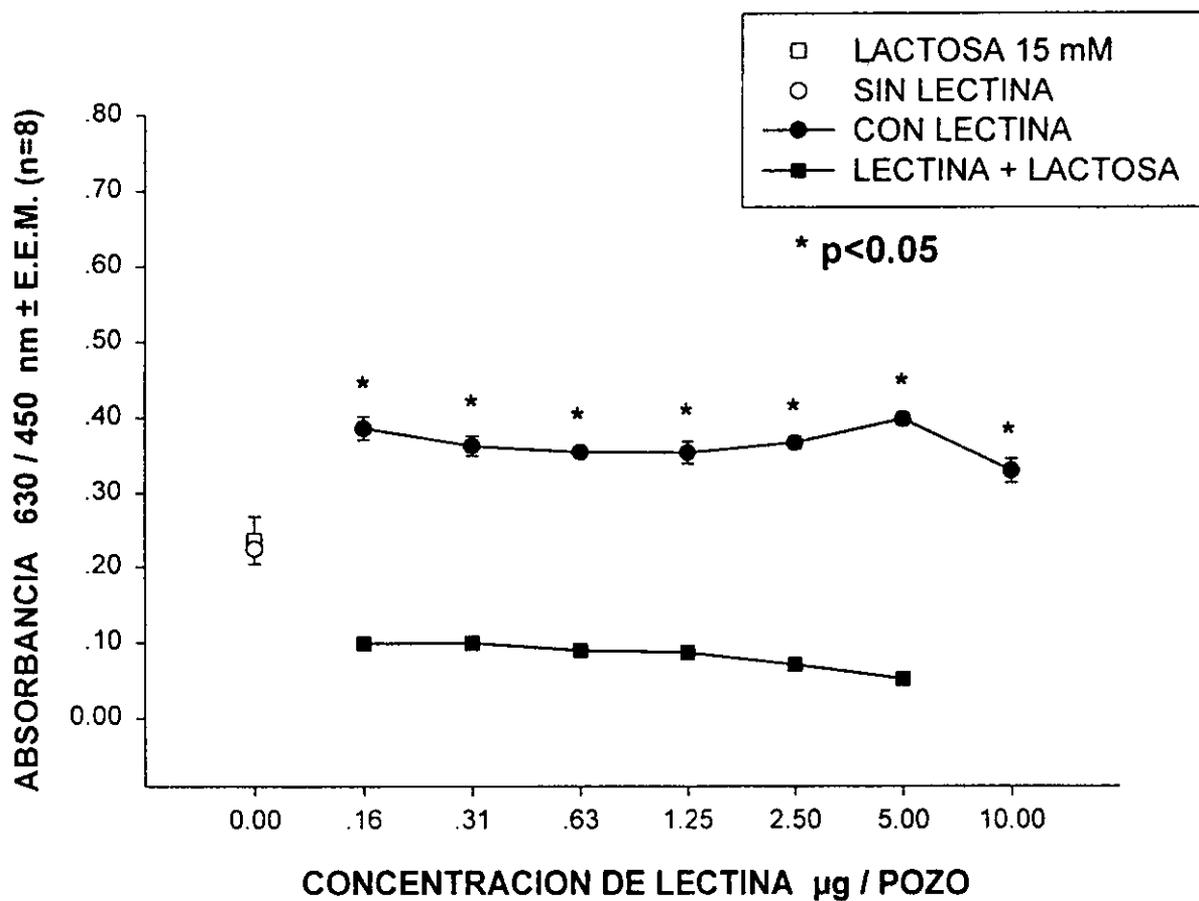


FIGURA 4

EFFECTO DE LA LECTINA de coleoptilo de *Zea mays* (EXPOSICION 24h) EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS (72 h). DE RATON Balb/c EVALUADO MEDIANTE REDUCCION DE NBT

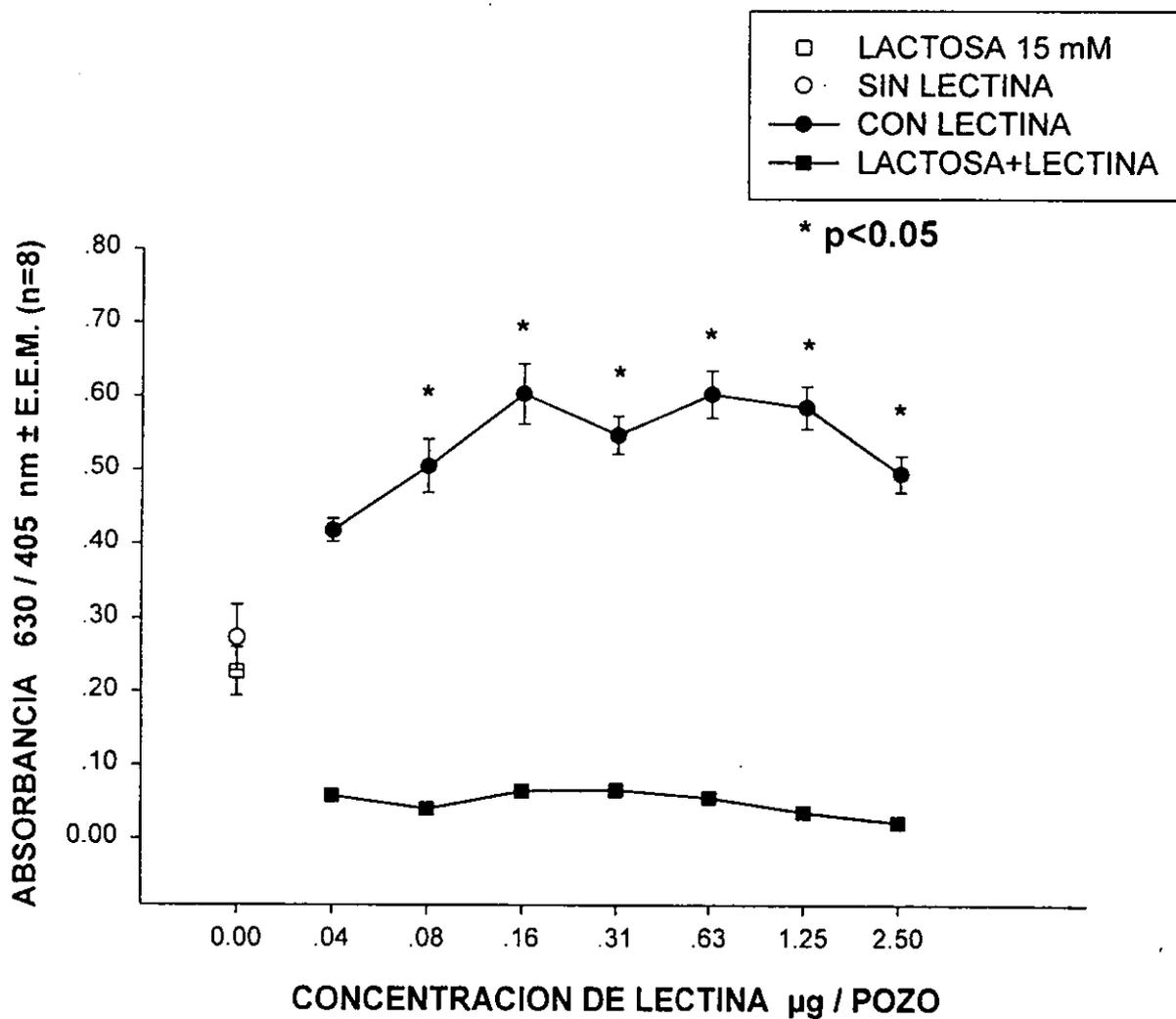
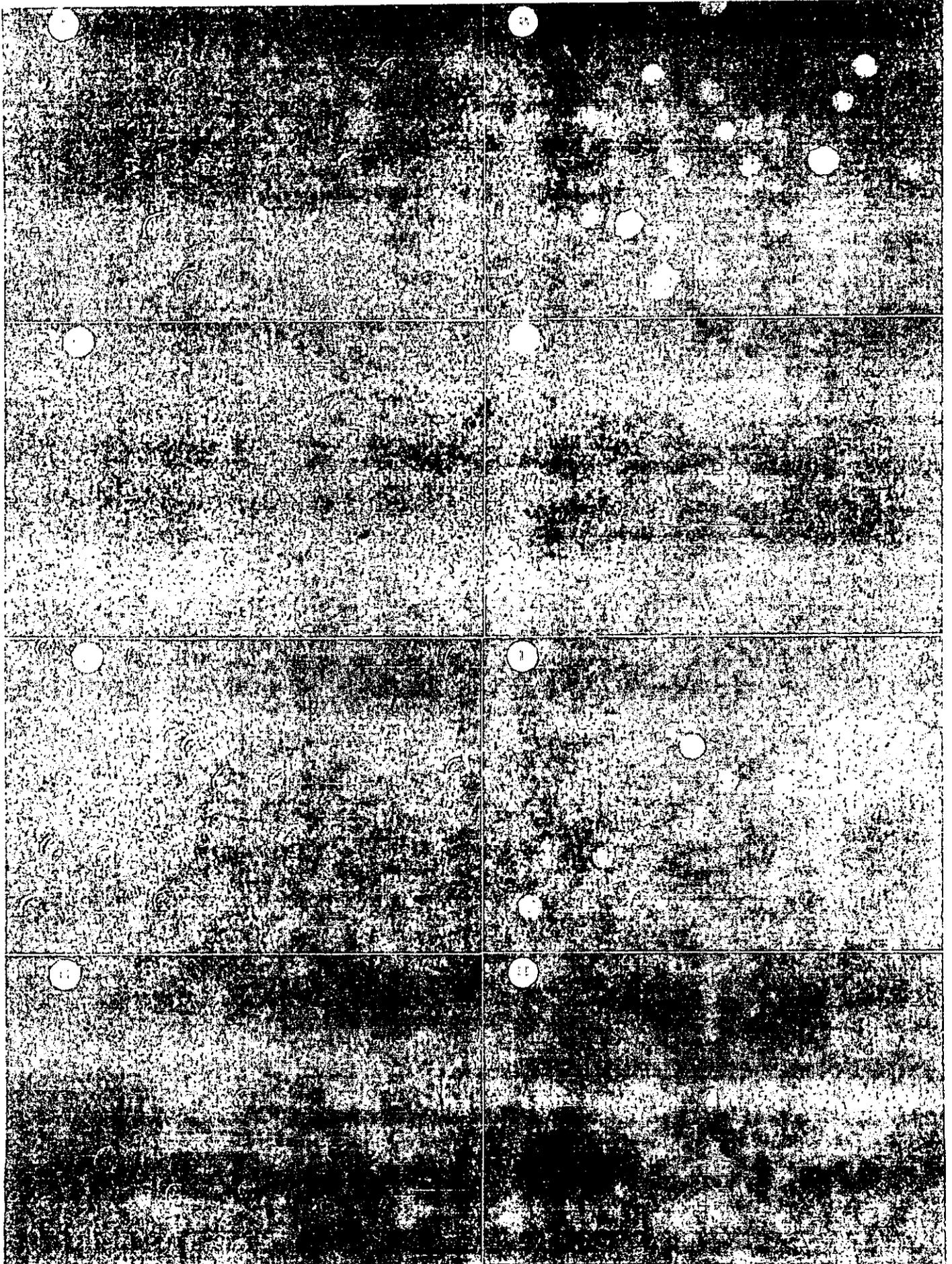


FIGURA 5

EFFECTO DE LA LECTINA de coleoptilo de *Zea mays* (EXPOSICION 24h) EN LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA DE MACROFAGOS PERITONEALES INDUCIDOS (72 h). DE RATON C57BL/6 EVALUADO MEDIANTE REDUCCION DE NBT

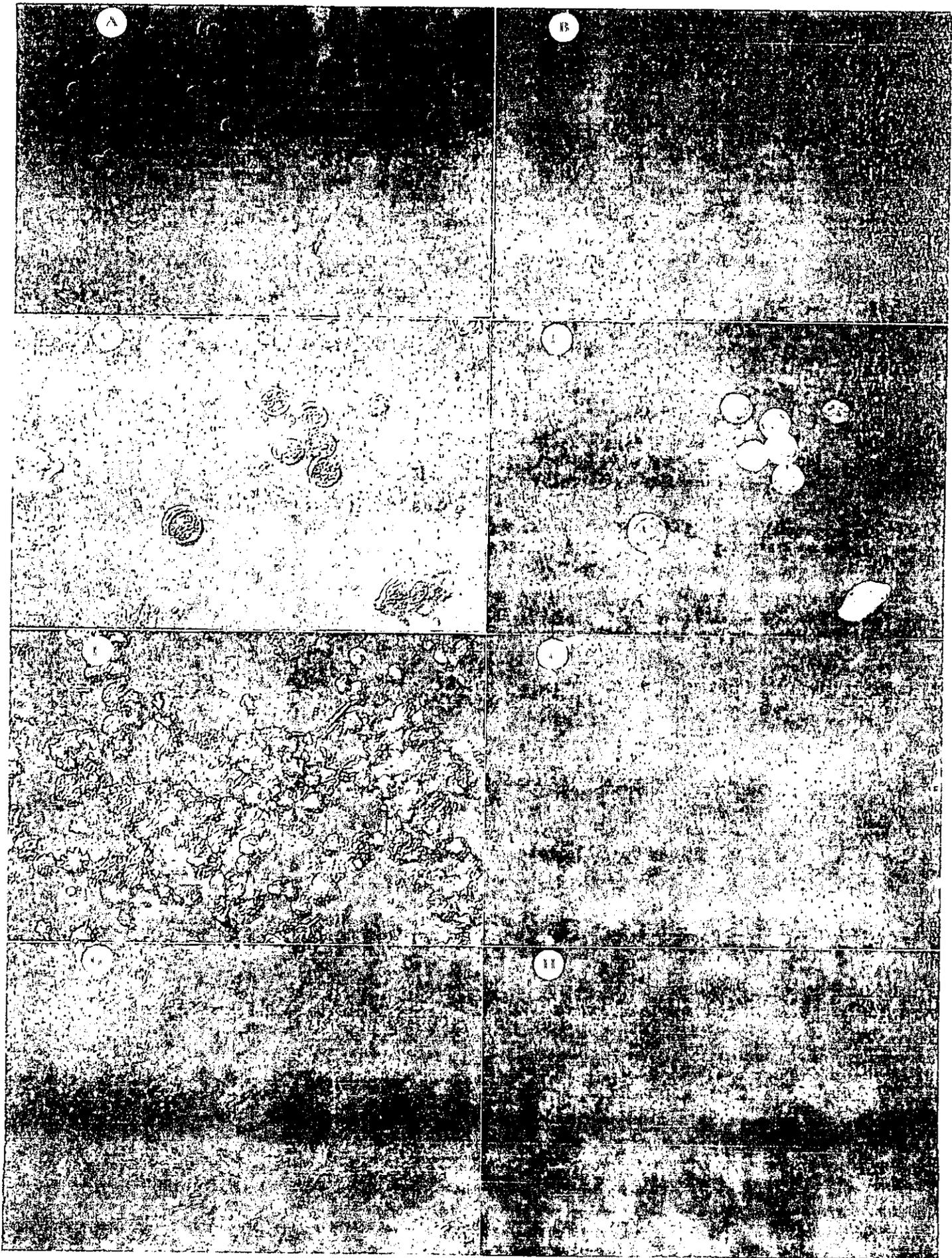
PANEL I

Timocitos y esplenocitos murinos de ratón C57BL/6: (A) timocitos, DIC (1000X); (B) timocitos marcados con faloidina-rodamina, epifluorescencia (1000X); (C) timocitos, DIC (1000X); (D) timocitos marcados con LCM fluoresceinada, epifluorescencia (1000X); (E) esplenocitos, DIC (1000X); (F) esplenocitos marcados con faloidina-rodamina, epifluorescencia (1000X); (G) esplenocitos, DIC (1000X); (H) esplenocitos marcados con LCM fluoresceinada, epifluorescencia (1000X).



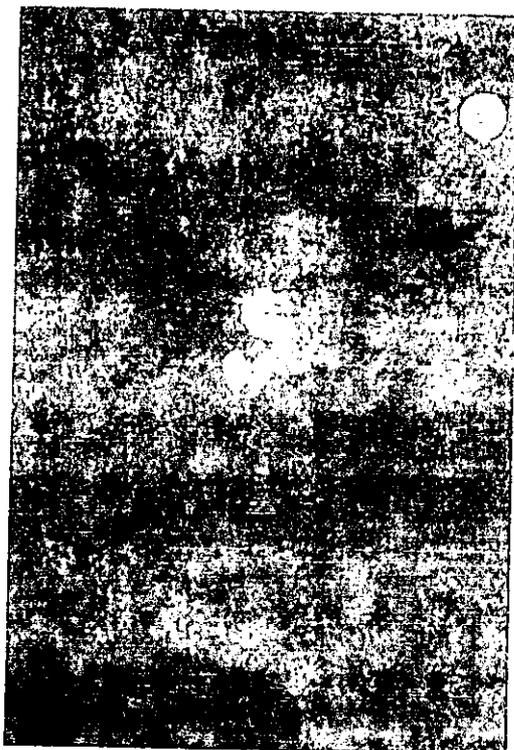
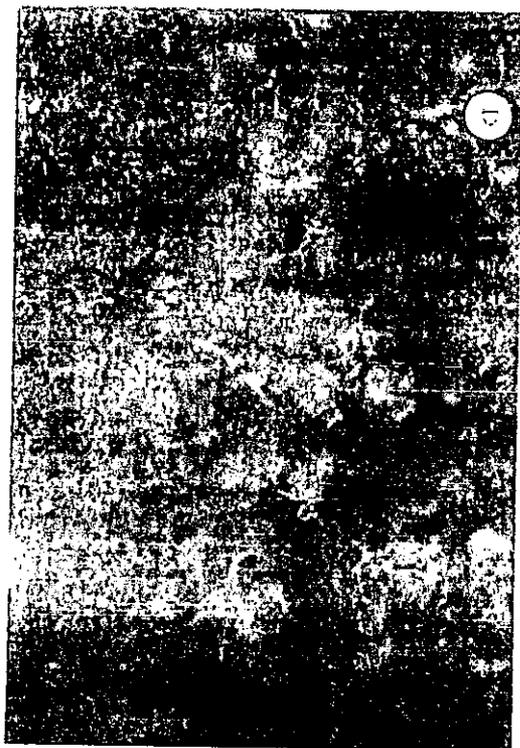
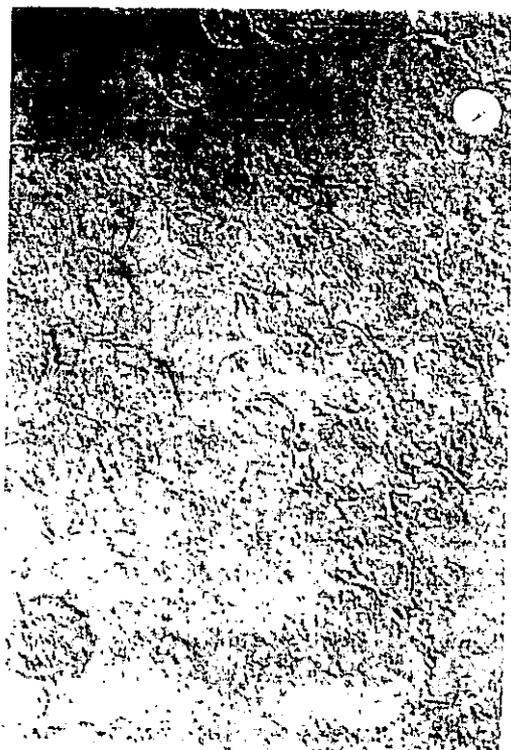
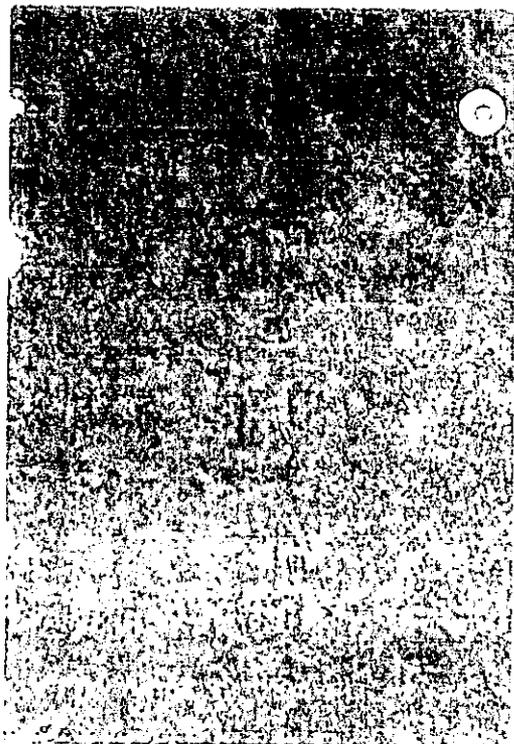
PANEL II

Macrófagos peritoneales murinos de ratón C57BL/6: (A) macrófagos residentes, DIC (400X); (B) macrófagos residentes incubados con LCM fluoresceinada, epifluorescencia (400X); (C) macrófagos residentes , DIC (1000X); (D) macrófagos residentes marcados con faloidina-rodamina, epifluorescencia (1000X); (E) macrófagos inducidos, DIC (400X); (F) macrófagos inducidos, marcados con LCM fluoresceinada, epifluorescencia (400X); (G) macrófagos inducidos, DIC (1000X); (H) macrófagos inducidos marcados con LCM fluoresceinada, epifluorescencia (1000X).



PANEL III

Macrófagos peritoneales inducidos de ratón C57BL/6: (A) macrófagos, DIC (1000X); (B) macrófagos marcados con LCM fluoresceinada y faloidina-rodamina, epifluorescencia (1000X); (C) macrófagos, DIC (1000X); (D) macrófagos marcados con LCM fluoresceinada y faloidina-rodamina, epifluoresceina (1000X).



ANALISIS DE RESULTADOS

En base a los resultados obtenidos con timocitos y esplenocitos, incubados con lectina de coleoptilo de maíz determinamos que esta glicoproteína no es un mitógeno. La lectina de coleoptilo de maíz reconoce aproximadamente el 1.7% de la población celular de timo y bazo.

Por otra parte los resultados muestran que la lectina de coleoptilo de maíz no tiene efecto en la actividad fagocitaria de macrófagos murinos residentes. El porcentaje de reconocimiento en esta estirpe celular, por parte de la lectina de coleoptilo de maíz, es de cero. Sin embargo en macrófagos inducidos, de dos cepas murinas singénicas con haplotipos diferentes (Balb/c y C57BL/6), si se observa efecto en la actividad fagocitaria. Esta actividad estimulante coincide con lo reportado para otras lectinas como son la lectina de germen (44) y la Concanavalina-A (45). La actividad observada con la lectina de coleoptilo de maíz es inhibida al preincubar la lectina de coleoptilo de maíz con α -lactosa; el carbohidrato natural de mayor simplicidad por el cual la LCM tiene más afinidad, fenómeno que no ocurre al utilizar otros carbohidratos como N-Acetilgalactosamina o α -manosa (datos no mostrados). Lo cual nos indica que el incremento en la actividad fagocitaria observado es provocado por la interacción de la lectina de coleoptilo de maíz con alguna(s) estructura(s) glicosídica(s), presentes en la membrana citoplásmica.

Lo anterior nos indica que la(s) molécula(s) reconocidas por la LCM se encuentran en mayor proporción en macrófagos murinos que en timocitos o esplenocitos, y los macrófagos deben encontrarse inducidos. Esto no es extraño ya que muchas determinantes antigénicas aparecen, desaparecen o simplemente varían su cantidad en forma dependiente del estado de maduración o activación.

CONCLUSION

Podemos concluir que la lectina de coleoptilo de maíz no muestra actividad mitógena en células de timo o bazo, incrementa la actividad fagocitaria en macrófagos peritoneales inducidos y reconoce a toda esta población. Hasta el momento ignoramos cual pudiera ser el ligando que reconoce la LCM en estas células y la manera en que interaccionan ambos para desencadenar estos efectos, por lo que proponemos a la LCM como una herramienta para identificar a dicha estirpe celular en un estado de probable activación.

Por lo que consideramos pertinente continuar con los estudios que nos permitan identificar y aislar este ligando, así como conocer el mecanismo de estimulación del proceso estudiado.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S.: *Celular and molecular Immunology*. W. S. Saunders Company 2^a ed., (1994).
- 2. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D.: *Immunology*. Grover Medical Publishing 2^a ed. USA, (1989).
- 3. Sharon, N., Lis, H., *Science*, **246**: 227-234, (1989).
- 4. Hans, J. G., *Isi Atlas of Science: Biochemestry*, 210-213, (1988).
- 5. Austyn, J.M., Wood, K.J.: *Principles of Celullar and Molecular Immunology*. Oxford University Press, (1993).
- 6. Hakomori, S., *Trends Bochemical Science*, **9**, 455, (1984).
- 7. Rosen, S. D., *seminars in IMMUNOLOGY*, **5**, 237-247, (1993).
- 8. Chávez-Sánchez, R., Reyes-Leyva, J., Maldonado-Mercado, G., Vázquez-Navarrete, L., Estrada-Parra, S., Gorocica-Rosete, P., Zenteno, E., *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México*, **7**, 67-76, (1994).
- 9. Van Damme, E.J.M., Peunams, W.J.: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. (Van, Driessche, E., Rougé, P., Beeckmans, S., Bog-Hansen, T.C. Eds.), Textop, Hellerup Dinamarca. **Volumen 11**, pp. 17-27, (1996).
- 10. Sharon, N., Lis, H., *Science*, **177**, 949-959, (1972).
- 11. Boyd, W., Reguera, R., *Journal of Immunology*, **62**, 333-339, (1949).
- 12. Yang, H., Czapla, T.H., *Journal of Biological Chemestry*, **268**, 5905-5910, (1993).
- 13. Wilkins, T.A., Rainkhel, N.V., *The Plant Cell*, **1**, 541-549, (1989).
- 14. Ashwell G., Moreil, A.G., *Advances in. Enzymology.*, **41**, 99, (1974).
- 15. Goldstein I.J., Poretz, R.D.: *Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Academic Press, Orlando, pp. 35-247, (1986).
- 16. Roberts, D.M., Etzler, M.E., *Plant Physiology*, **76**, 879-884, (1984).
- 17. Quinn, J.M., Etzler, M.E., *Archives of Biochemestry and Biophysics* **258**, 535-544, (1987).
- 18. Etzler, M.E.: *The Lectins*. (Leiner, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J., Eds.).

Academic Press, New York, pp. 371-435, (1986).

- 19. Hamblin, J., Kent, S. P., *Nature (New Biol)*, **245**, 28, (1973).
- 20. Janzen, D.H., Juster, H.B., Liener, I.E., *Science*, **192**, 795-796, (1976).
- 21. Sharon, N., *Immunology Today*, **5**, 143-147, (1984).
- 22. Kobilier, D., Mirelman, D., *Infection and Immunity*, **29**, 221-225, (1980).
- 23. Vanderberg, J.P., Gupta, S.K., Schulman, S., Oppenheim, J.D., Furthmayr, H., *Infection and Immunity*, **47**, 201-210, (1985).
- 24. Lis, H., Sharon, N.: *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. Academic Inpress, New York, (1986).
- 25. Lis, H., Sharon, N.: *The Antigens*. (M. Sela Ed.). Academic, New York. **Volumen 4**, pp. 429-529, (1977).
- 26. Lis, H., Sharon, N.: *Biology of Carbohydrates*. (V. Glinsburg, P.W. Robbins, Eds.). Wiley, New York. **Volumenn 2**, pp. 1-85, (1984).
- 27. Sharon, N., *Advances Immunology*. **34**, 213-298, (1983).
- 28. Maldonado, G., Gorocica, P., Agundis, C., Pérez, A., Molina, J., Zenteno, E. *Glycoconjugate Journal*, **15**, 615-622, (1998).
- 29. Van Damme, E. J.M., Smeets, K., Van Driessche, E., Peumans, W. J.: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. (Van Driessche, E., Franz, H., Beeckmans, S., Pfüller, U., Kallikorm, A., Bog-Hansen, T. C., Eds.). publicado por Textop, Hellerup (Dinamarca). **Volumen 8**, pp. 73-81, (1993).
- 30. Harrison, F.L., chesterton, C.J., *FEBES Letters*, **122**, 157, (1980).
- 31. Van Driessche, E.: *Advances in Lectin Research*. (Franz, H., Ed.). VEB Verlag. **Volumen. 1**, pp. 73-134, (1989),
- 32. Gabius, H.-J., *Trends. Glycoscil. Glycotechnol.*, **6**, 229, (1994).
- 33. Lepekhin, E. A., Yalovoj, A. I., Rybak, V. I. *Fiziologiya/rastenij (USSR)*, **33**, 390-394, (1986).
- 34. Jankovic, M., Cuperlovic, M., Hajdukovic, L., *Plant Physiology*, **93**, 1659-1662, (1990).
- 35. Huelsen, Walter A.: *Sweet Corn*. (Kertesz, Z. I. Ed.). Interscience publishers, Inc., New York. **Volumen 4**, pp 7-27, (1954).

- 36. Benson, G. O., Pearce, R. B.: *CORN Chemistry and Technology* (Watson, Stanley A., Ramstad, Paul E. Eds.). Publicado por American Association of Cereal Chemistry Inc., St. Paul, Minnesota, USA. pp 1-34, (1987).
- 37. Mérida, A., Vasquez, L., Martínez, M., Aquino, T., Pérez-Campos, E., Córdoba, F., *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **60**, 2064-2065, (1996).
- 38. Martínez, M. A., Zenteno, E., Córdoba, F.: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. (Van Driessche, H. Beeckmans, U. Pfüller, A. Kallikorm, T. C. Bog-Hansen, Eds.). Publicado por Textop, Hellerup Denmark. **Volumen 8**, pp 132-136, (1993)
- 39. McCarron, R. M., Goroff, D. K., Luhr, J. E., Murphy, M. A., Herscowitz, H.B.: *Methods in enzymology*. **Volumen 108**, pp. 274-297, (1984).
- 40. Mosmann, T., y cols. *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55, (1983).
- 41. Rook, G. A., Steele, J., Umar, S., Dockrell, H. M., *Journal of Immunological Methods*, **82**, 161-167, (1985).
- 42. Kinn, S. R., Curtis, A., Dow, J. A. T., *Journal of Immunological Methods*, **134**, 243-251, (1990).
- 43. Symons, M.H., Mitchison, T.J., *The Journal of Cell Biology*, **114**, 503-513, (1991).
- 44. Gallyly, R., Vray, B., Stein, I, Sharon, N., *Immunology*, **52**, 679-686, (1988).
- 45. Bodo, M., Becchetti, E., Baroni, T., Mocci, M., Merletti, L., Giammarioli, M., Calvitti, M., Sbaraglia, G., *Cellular and Molecular Biology*, **41**, 297-302, (1995).
- 46. Dong, S., Hughes, R.C., *Glycoconjugate Journal*, **14**, 267-274, (1997).
- 47. Ho, May-Kin, Springer, Timothy A., *Journal of Immunology*, **128**, 1221-1228, (1982).
- 48. Wright, S.D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C., *Science*, **249**, 1431-1433, (1990).
- 49. Adams, D.O., Hamilton, T.A.: *The natural immune system. The Macrophage*. (Lewis, C.E., McGee, J.O'D, Eds.), Oxford University Press. pp. 3-56, (1992).