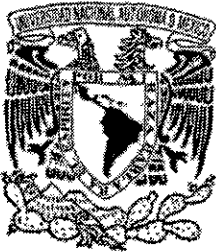


63
2E



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTTLAN

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FITOHEMOAGLUTININA,
OBTENIDA DE *Phaseolus vulgaris*. II.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD
FITOHEMOAGLUTINANTE DURANTE EL PERIODO DE DESARROLLO
DE *Phaseolus vulgaris*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA DE LOURDES TREJO HERNANDEZ

ASESORES: DR. RICARDO SANTIAGO DIAZ

DR. BENITO LOPEZ BAÑOS

CUAUTILAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

275007



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Purificación y caracterización de Fitoheмоaglutinina, obtenida
de Phaseolus vulgaris. II. Evaluación de la actividad
fitohemoaglutinante durante el período de desarrollo de
Phaseolus vulgaris.
que presenta la pasante: María de Lourdes Trejo Hernández
con número de cuenta: 8007898-6 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 19 de enero de 199 9.

PRESIDENTE	<u>Dr. Ricardo Santiago Díaz</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa</u>	
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C. Alma Virginia Lara Sagahón</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	

Divina señora que estás en el cielo,
divina señora que estás en la tierra;

Poema Tzotzil

Recuerdo, recordemos
hasta que la justicia se sienta entre nosotros.

Rosario Castellanos

No acabarán mis flores,
no cesarán mis cantos.

Netzahualcoyotl

De vez en cuando hay que hacer
una pausa.

Mario Benedetti

La última palabra aún no ha sido dicha.

Mario Benedetti

...Piensa en la tejedora; en su paciencia
para recomenzar una letra siempre inacabada

Rosario Castellanos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Señor por tener la oportunidad de lograr culminar esta etapa de mi vida, que todo mi esfuerzo y dedicación lograron su objetivo.

A mis padres por su estímulo: Juan Trejo,

Elsa Hernández que siempre encontró la forma de darme aliento a seguir adelante, por demostrarme que con esfuerzo se logra lo que quieres.

A mi querido Rodolfo, mi compañero que siempre me ha enseñado a recorrer caminos que tienen corazón.

A mis queridos hermanos: Juan(), Víctor y Elsa que de una u otra forma me estimularon a salir adelante

A mis queridos Sobrinos: Elsa, Alejandro, Gloria y Juan Luis que también son motivos para mi desarrollo

A mis asesores: Dr. Ricardo Santiago D. y Dr. Benito López B., por todo el apoyo, paciencia y aliento para lograr este trabajo y por la gran amistad que me brindan.

A las profesoras Sinodales: Q.F.B. Idalía Avila, Q.F.B. Ma. Esther Revueltas, M. en C. Alma Virginia Lara y M en C. Sandra Díaz por su paciencia y comprensión en la revisión.

A la U.N.A.M., a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y a sus profesores que me brindaron la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y en forma personal.

A las profesoras del Laboratorio de Genética Sandra y Rosalba y la Laboratorista Silvia por su apoyo y consejo para realizar este trabajo.

Especialmente a los profesores de posgrado: Dra. Susana, Dr. Andrés, Dr. Alvaro, Dra. Nidia y M.V.Z: Alejandra por su apoyo, consejo y comprensión.

Al departamento de Servicio Social: M.V.Z: Rogelio B., Lic. Rosa Alfaro y Sra. Irma por su estímulo y comprensión

A mis queridos compañeros QFB: Verónica, Sandra, Carmen, Jorge A., Silvia, Ernesto, Angélica, Adriana, Leticia, Blanca, Gloria, Yolanda y todos los que compartieron momentos importantes.

A todas las compañeras Enfermeras del Hospital de Especialidades C.M.R. en especial a Elvira, Gloria, Rebeca, Yolanda, Dora, Esther y Lupita de las que siempre tuve apoyo y aliento

A todo el personal de Laboratorio del Centro Medico La Raza por su apoyo

A los compañeros del proyecto IPEIC: Germán, Rosita, Noel, Rafael, Alicia, Ernestina y Vicky

A Juanita Godínez por su paciencia para transcribir este trabajo con gran empeño

L o u r d e s

INDICE

	Hoja
I.- RESUMEN	1
II.- INTRODUCCION	2
1.- Propiedades fisicoquímicas de algunas lectinas	5
2.- Usos de la Fitohemoaglutinina	15
3.- Métodos de Extracción	17
4.- Justificación	23
OBJETIVO	24
HIPOTESIS	24
III.- MATERIAL Y METODOS	25
Metodología	26
1.- Extracción de la Fitohemoaglutinina	28
2.- Cuantificación de Proteínas	31
3.- Actividad hemoaglutinante y mitogénica	35
4.- Análisis de resultados	38
IV.- RESULTADOS	39
1.- Proteínas totales	41
2.- Actividad hemoaglutinante y mitogénica	43
3.- Comparación de Proteínas y Actividad hemoaglutinante y mitogénica	46
4.- Análisis de la correlación de resultados	48
V.- DISCUSION	52
VI.- CONCLUSIONES	56
VII.- BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS	H o j a
Cuadro # 1.- Propiedades de algunas lectinas	4
Esquema # 1.- Características de las fracciones E-PHA y L-PHA	7
Cuadro # 2.- Propiedades químicas y fisicoquímicas de algunas fitohemoaglutininas	9
Cuadro # 3.- Lectinas específicas para determinar grupos sanguíneos A, B y subgrupos D, N.	12
Cuadro # 4.- Lectinas con actividad mitogénica sobre poblaciones de linfocitos	14
Cuadro # 5.- Usos de las fitohemoaglutininas	16
Esquema # 2.- Método modificado de extracción de la Fitohemoaglutinina	31
Cuadro # 6.- Datos de la curva estándar de proteínas	33
Figura # 1.- Gráfica de curva estándar de proteínas	34
Cuadro # 7.- Las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	40
Tabla # 1.- Proteínas totales durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	41
Gráfica # 1.- Proteínas totales durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	42
Tabla # 2.- Comparación de la actividad hemoaglutinante y mitogénica de fitohemoaglutinina durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	43
Gráfica # 2.- Actividad hemoaglutinante de fitohemoaglutinina durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	44

Gráfica # 3.- Actividad mitogénica de fitohemoaglutinina durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	45
Tabla # 3.- Comparación en las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> proteínas totales, actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica	46
Gráfica # 4.- Comparación de proteínas totales, actividad hemoaglutinante y mitogénica de fitohemoaglutinina durante etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>	47
Tabla # 4.- Resultados del ajuste de los modelos de regresión a la relación entre días de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> y concentración de proteínas totales	48
Tabla # 5.- Resultados del ajuste de los modelos de regresión a la relación entre días de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> y título de hemoaglutinación	49
Tabla # 6.- Resultados del ajuste de los modelos de regresión a la relación entre días de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> y actividad mitogénica	50
Tabla # 7.- Resultados del análisis de correlación para determinar la relación entre concentración de proteínas y título de hemoaglutinación durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc = Adenosil Mono Fosfato cíclico

c. e. = coeficiente de extinción

Ca⁺⁺ = catión de Calcio

Cu⁺⁺ = catión de Cobre

DNA = Acido Desoxirribonucleico

E - PHA = Fracción E de la fitohemoaglutinina

HAM F-10 = Medio mínimo de cultivo F- 10

kDa = kilo Dalton

L - PHA = Fracción L de la fitohemoaglutinina

Mn⁺⁺ = catión de Manganeso

pH = Potencial de iones Hidrógeno

pKa = valor pH de la constante de disociación de una sal

pI = punto isoelectrico

P. C. = Computadora personal

P. M. = Peso Molecular

PHA = Phytohemoagglutinin = Fitohemoaglutinina

Rh = Factor Rho de grupo sanguíneo

RNA = Acido Ribonucleico

RESUMEN

La fitohemoaglutinina existe en gran variedad de leguminosas, las fitohemoaglutininas tienen las propiedades de aglutinar eritrocitos y en algunos casos inducir la actividad mitogénica de células; estas actividades varían dependiendo de la fuente de origen de la fitohemoaglutinina, así como del tipo de células en que se pruebe (5,45,67,68).

En este trabajo se identifican los cambios en la actividad fitohemoaglutinante de la fitohemoaglutinina obtenida durante el período de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*, utilizando como fuente de obtención de la fitohemoaglutinina la variedad de frijol negro comercial. Se observa que conforme comienza el desarrollo de la planta la cantidad de proteína y la actividad hemoaglutinante sufre un decremento a partir del día 10 que es cuando se encuentra en etapa de plántula y la disminución se mantiene hasta el día 78 cuando ya esta madurando el ejote, comenzando a incrementarse los valores hasta la obtención de la semilla nuevamente con una tendencia a recuperar los valores iniciales.

En la actividad mitogénica se observa un incremento el día 2, (durante la etapa de germinación) y posteriormente disminuye a un valor que se mantiene aunque se incrementa nuevamente el día 60, (durante la etapa de floración) pero no fue posible su cuantificación en todas las etapas por lo que no podría evaluarse su comportamiento en forma constante. Estos cambios podrían explicar la regulación génica que realiza la planta.

Esta fitohemoaglutinina utilizada en el laboratorio para las técnicas de Citogenética, produce resultados con una calidad satisfactoria y podría ser semejante a la de un producto comercial. Para fines de mitosis la fitohemoaglutinina se puede extraer en cualquier etapa de crecimiento.

INTRODUCCION

La fitohemoaglutinina es una glucoproteína que pertenece a un grupo conocido como lectinas, las cuales son una clase de proteínas definidas por su capacidad de combinarse específica y reversiblemente con oligosacáridos (6,12), así como poseer las propiedades de aglutinar eritrocitos (6,30) y en algunas ocasiones pueden inducir la actividad mitogénica (6,33,44,67). Cabe mencionar que el término de glucoproteína se restringe a las proteínas combinadas con grupos de carbohidratos en más del 4% (5,35).

Las fitohemoaglutininas se conocen desde el siglo pasado como aglutinina y fue utilizada por su capacidad de aglutinar a los hematíes de humano y de algunos animales tales como: conejo, ratón, perro, pollo, pato, rata, etc. (7,13).

En 1960 fue reportado un efecto mitogénico en leucocitos durante un corto tiempo de cultivo a partir de una mínima cantidad de sangre periférica *in-vitro* (3,31,35). En humanos aglutinan eritrocitos inespecíficamente de todos los grupos sanguíneos, sin importar el factor Rh, sexo y presencia de anticoagulantes (7,19).

La Fitoheмоaglutinina (PHA) puede ser obtenida a partir de la especie *Phaseolus communis* (judía blanca) y de la especie *Phaseolus vulgaris* (judía roja) sin embargo es posible extraerlo de otras leguminosas dentro de la especie *Phaseolus vulgaris* (10,37,57), y varios tipos de leguminosas y semillas.

Las lectinas en general, son componentes de la semilla y pueden presentar más del 2% del peso seco. Además existen en todos los organismos dentro del reino vegetal como en el reino animal (10,18,54).

Las lectinas han tenido interés por sus efectos en una gran variedad de sistemas biológicos (33,50), siendo algunas propiedades que se le atribuyen, las que se enumeran en el cuadro # 1.

CUADRO # 1. PROPIEDADES DE ALGUNAS LECTINAS: Propiedades que se han observado en diferentes sistemas biológicos

Propiedades	Referencias
1.- Aglutinación de los eritrocitos	(19,22,67,68)
2.- Aglutinación de células transformadas después de una infección viral	(38,67,68)
3.- Citotoxicidad	(20,50,62,67)
4.- Estimulación mitogénica de los linfocitos	(3,13,17,20,68)
5.- Efectos inmunosupresivos	(1,54,67,68)
6.- Inhibición de la formación de vacuolas en los macrófagos	(20,43,68)
7.- Inhibición del crecimiento de células tumorales	(1,42,53,67)
8.- Inhibición de la migración de células tumorales	(1,17,31,53)
9.- Inhibición del crecimiento de hongos	(8,27,67)
10.- Inhibición de la fertilización del óvulo por el espermatozoide	(33,58,67)
11.- Inducción de la liberación de histamina por los basófilos	(20,44,61,67)
12.- Inducción de la liberación de insulina por los islotes pancreáticos	(4,25,67)
13.- Precipitación de algunas proteínas del suero de pacientes normales	(4,19,26,49)
14.- Reguladora en el crecimiento de algunos insectos	(17,19)
15.- Unión de bacterias fijadoras de Nitrógeno en leguminosas y protección contra fitopatógenos	(5,10,14,24,27,30,44)

1.- PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE ALGUNAS LECTINAS

Las lectinas o fitohemoaglutininas son generalmente extraídas de plantas como leguminosas (8,34,56). La estructura primaria de algunas lectinas es similar en los primeros 24 residuos de aminoácidos (23,29,34,55); mediante pruebas de hemoaglutinación, inmunodifusión y electroforesis se encontró evidencias de que las lectinas tienen distribución en todas las partes de la planta en diferentes porcentajes (9,11,34), y también tienen algún papel en la asociación que hay entre las raíces de las leguminosas y las bacterias del género *Rhizobium* que son fijadoras de Nitrógeno (5,10,11,44).

Existen numerosas lectinas las cuales poseen propiedades diferentes de acuerdo con la fuente de obtención (34,39,59). A continuación se describen las propiedades de algunas de las hemoaglutininas que ya han sido purificadas:

Fitohemoaglutinina del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*).- Fue el primer frijol en que se encontró actividad mitogénica además de actividad aglutinante (54), algunos investigadores han intentado separar ambas actividades pero los resultados han sido contradictorios y algunos confusos. En 1951, Rigas aplicó un método para obtener las fitohemoaglutinina del frijol rojo, (*Phaseolus vulgaris*) tratándola como una glucoproteína, encontrando que a un pH 1.0 se disocia en dos componentes una proteína hemoaglutinante y un polisacárido inactivo. Posteriormente realizó una extracción tratándolo como proteína (55,56,57), y observó que tiene un comportamiento diferente como proteína conjugada con azúcares que como proteína sola.

La glucoproteína se comporta como una molécula homogénea en electroforesis en el rango de pH 5.8 - 8.6. Por abajo del pH de 5.8, se disocia en una proteína aglutinante y un polisacárido inactivo. La glucoproteína es soluble en agua destilada, solución salina al 1%, solución buffer de fosfatos 0.01 M y 0.03 M a pH 2.0 - 8.0, con un punto isoeléctrico de 5.6 (34,55,56,57), lábil a temperatura de 100 °C; contiene 6.5% de Nitrógeno y 10.4 % total de carbohidratos reductores.

Como proteína se comporta también como una sustancia homogénea en electroforesis con un rango de pH 2.0 - 8.0. En un campo electroforético se encontró que a un pH 2.0 se comporta como ion, la proteína es insoluble en agua, soluble en soluciones salinas al 0.85% en soluciones buffer de fosfatos 0.01 M y 0.03 M a pH 2.0, 6.4 y 8.0; tiene un punto isoeléctrico de 6.5 y se encontró mayor actividad aglutinante que la glucoproteína (55,56,57). El contenido de Nitrógeno es 14.6 % y un total carbohidratos reductores de 3.4 %

Debido a las propiedades que se le encontraron de hemoaglutinante y de inducción de la mitosis (16,20,35,68), surgió la duda de si se podrían caracterizar dichas actividades; lográndose en un principio separar dos fracciones cada una compuesta de cuatro monómeros con diferentes propiedades; identificadas como fitohemoaglutinina-E (E-PHA), y la fitohemoaglutinina-L (L-PHA). Se encontró que las dos fracciones identificadas compartían la misma secuencia de aminoácidos del residuo 8 al 24 (29,34,47,60).

ESQUEMA # 1 Características de las fracciones E-PHA y L-PHA (3,47,48,55)

Fracciones	c.e.	Rf.	P. M. (kDa)	p I	s° 20w	Actividad aglutinante	Mitogénico
E-PHA; E ₄ (32,38,56,60)	6.0	23.5	150	6.5	7.1	potente	poco
			142	5.95	7.2	eritroaglutinante	mitogénico
L-PHA; L ₄ (3,32,46,48)	3.4	22.5 a 34.4	115	5.0	6.5	poca actividad	potente
			140	5.25	6.8	hemoaglutinante	mitogénico
			142	5.5	7.0		

c.e. = Coeficiente de extinción

Rf. = valor del coeficiente de fricción al desplazarse la partícula

P. M. = Peso Molecular (kilo Dalton) kDa

p I = punto isoeléctrico

s° 20 w = constante de sedimentación

Ambos tetrámeros mostraron capacidad de interacción con ciertas proteínas de suero humano como la tiróglobulina humana (8,23,34) por lo que Felsted-Leavit,1975 (21) diseñaron un método que demostró la unión de lectinas a la tiróglobulina porcina uniéndola a la Sefarosa (2,37). Después Miller (1975) estudió la fitohemoaglutinina en frijol rojo y supone que está compuesta de cinco fracciones que son heterogéneas por sus propiedades fisicoquímicas (36,46,47).

Fitohemoaglutinina de frijol judía amarilla (*Phaseolus vulgaris*). Estudiada posteriormente con un Peso Molecular = 132 kDa, contiene 10% de carbohidratos principalmente manosa, glucosa y en menor cantidad glucosamina, galactosa, arabinosa, xilosa y fructuosa. En el mismo frijol fue aislado un glucopéptido con peso molecular = 4.389 kDa con propiedades aglutinantes (24). Sus subunidades muestran actividad hemoaglutinante para lo cual requiere de la presencia de cationes bivalentes como Ca^{++} y Mn^{++} (20,24,37).

Se ha realizado una comparación sobre las hemoaglutininas aisladas por los diferentes autores y observamos que los parámetros fisicoquímicos los cuales describen el tamaño, forma y carga son diferentes en cada uno (17,29); en el cuadro # 2 se muestran algunas propiedades de Hemoaglutininas obtenidas de diferentes variedades de frijoles de la especie *Phaseolus vulgaris* (17,18).

Las reacciones de hemoaglutinación y mitogénica de la PHA se piensa que son mediadas por los complejos de carbohidratos los cuales se unen a la membrana celular, las reacciones de precipitación presumiblemente involucran la combinación de la PHA con carbohidratos solubles contenidos en el suero (20,22,26,51,64).

Cuadro # 2. PROPIEDADES QUIMICAS Y FISICOQUIMICAS DE ALGUNAS
FITOHEMOAGLUTININAS

Propiedades de las fitohemoaglutininas del frijol judía amarilla, frijol judía roja y frijol negro (55,58)			
PROPIEDADES	Frijol Judía amarilla (57)	Frijol Judía roja (57)	Frijol Negro (17)
Constante de sedimentación (s° 20w)	5.37	6.5	5.9
Coefficiente de difusión (cm ² seg ⁻¹ x 10 ⁻⁷)	3.7	4.8	--
Punto isoeléctrico (pI)	5.5	6.5	4.9
Contenido de carbohidratos (%)	10.4	3.4	5.7
Peso molecular (kDa)	121 a 132	128	126 a 130

Se ha modificado la concepción que inicialmente se tenía sobre la aglutinación de eritrocitos que no era específica para algún grupo sanguíneo, viéndose después que algunas lectinas sí mostraban especificidad como la Haba de Lima la cual fue la primer lectina que mostró especificidad sobre un grupo sanguíneo de Tipo A (19,33,68), más tarde Karl Landsteiner durante sus estudios de tipificación de grupos sanguíneos, encontró que los extractos de ciertas semillas aglutinan determinados grupos de eritrocitos.

Extractos de garbanzo y lenteja, aglutinan sangre de conejo y no glóbulos rojos humanos (37). Igualmente se ha observado que las variedades de *Phaseolus vulgaris* aglutina sangre humana de todos los grupos sanguíneos pero en forma más fuerte el tipo O Rh positivo (17,49).

Actualmente se ha logrado reunir información de cientos de extractos con actividad aglutinante de fuentes que van en la Escala Filogenética desde bacterias, moluscos (7,32,49,54) organismos superiores; vegetales como semillas, frutos; (44) animales como conejos o aves (33,47).

Aunque la gran mayoría no son específicas para los grupos sanguíneos por que hay lectinas que aglutinan 2 o 3 grupos (46,49), se puede decir que se cuenta con dos lectinas de actividad aglutinante específica para cada grupo sanguíneo del sistema A B O humano. (19,46,54,68).

Los antisueros utilizados para tipificar los grupos sanguíneos A, B, O; reconocen la parte reductora de la cadena glucosídica de la parte antigénica que forman los grupos sanguíneos (37,47,56), mientras que las lectinas son capaces de reconocer los azúcares aunque estos se encuentren en la parte intermedia de dicha cadena antigénica, por esta razón, muchas lectinas a pesar de ser específicas para un azúcar, como la de cacahuete o la de *Ricinus communis* que ambas reconocen a la galactosa, no aglutinan exclusivamente eritrocitos del grupo sanguíneo B, a pesar de

que este azúcar es el determinante antigénico de este grupo (46,67).

Existen diversas lectinas que aglutinan eritrocitos del tipo D y A, pero existen pocos ejemplares de lectinas capaces de aglutinar eritrocitos B, (7) lo que dificulta en cierta medida la utilización rutinaria de estas sustancias en el laboratorio para la tipificación de grupos (17,68). En el Cuadro # 3 se presentan algunas lectinas que han sido aisladas capaces de aglutinar eritrocitos de los grupos A B y subgrupos D, N.

La utilización de lectinas con actividad mitogénica ha permitido conocer los eventos bioquímicos más importantes involucrados en el proceso de inducción de la división celular. La lista de lectinas mitogénicas es numerosa y las células sobre las que más se ha estudiado la capacidad mitogénica son los linfocitos.(3,5,15).

Cuadro # 3: LECTINAS ESPECÍFICAS PARA DETERMINAR GRUPOS SANGUÍNEOS A,B y subgrupos D, N. (46,67,68)

GRUPO SANGUINEO	Origen de la <u>lectina</u> que interacciona	Azúcar Principal
A	Dolichos biflorus	N-acetil-galactosamida
	Phaseolus limmensia	“ “
	Helix pomatia	“ “
B	Bandeirae simplicifolia	Galactosa
	Abrus precatorius	“
D	Lotus tetragonolobus	L - fucosa
	Anquilla anquilla	“
N	Vicia gramminea	Galactosa

Como se ha comentado, algunas lectinas parecen tener la habilidad de estimular solo a los linfocitos T (20,68), mientras que otras son específicas para linfocitos B (50,68). Otras lectinas que no son mitogénicas también muestran selectividad a diferentes poblaciones linfocitarias, (como se muestra en el cuadro 4), (20,41) reforzando la hipótesis de que la respuesta mitogénica de la célula no solo obedece a la adherencia de las moléculas de lectinas a la membrana celular (7,26,52), sino que también (depende del periodo en que se encuentre la célula) a todos los componentes que regulan el ciclo celular (6,33,58).

Se ha propuesto que el mecanismo de reacción mitogénica es mediado por el Adenosil Mono fosfato cíclico (AMPC) el cual estimula la síntesis de RNA mensajero (15,66). Otros investigadores, han considerado que la PHA actúa induciendo la síntesis del DNA (16,33), sin embargo otra propuesta es que hay una respuesta inmunológica específica para la PHA actuando como antígeno específico (31,52,61).

Utilizando lectinas mitogénicas se han logrado detectar variaciones en el número de moléculas de lectinas que se unen a linfocitos normales con respecto a linfocitos de pacientes con leucemia linfocítica crónica los cuales enlazan tres veces menos moléculas de lectinas y responden más pobremente a la actividad mitogénica de las mismas (67). En leucemia aguda los linfocitos de pacientes responden igual que linfocitos de personas normales (60,65). Estos hallazgos se han efectuado con lectinas conjugadas con fluoresceína que permiten detectar estas moléculas en la membrana celular confirmando así las observaciones que llevaron a Singer y Nicholson al modelo de membrana de "Mosaico Fluido" (59), que en la membrana celular los componentes proteicos y glicoproteicos se encuentran interaccionando en una matriz lipídica (4,56).

Cuadro # 4 LECTINAS CON ACTIVIDAD MITOGENICA SOBRE
POBLACIONES DE LINFOCITOS (20,66,67,68)

Lectina	Especificidad Celular	
	Linfocito B	Linfocito T
<i>Abrus precatorius</i>	+	+
<i>Amaranthus leucocarpus</i>	+	-
<i>Canavalia esnifaraís</i>	-	+
<i>Glycine max</i>	-	+
<i>Lens culinaris</i>	-	+
<i>Machaerocereus cruca</i>	-	+
<i>Phaseolus coccineus</i>	-	+
<i>Phaseolus limmensis</i>	+	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	+
<i>Phytolaca americana</i>	+	+
<i>Robinia pseudoacacia</i>	+	+
<i>Vlex europeus</i>	-	+

2.- USOS DE LA FITOHEMOAGLUTININA

Las fitohemoaglutininas han sido investigadas ampliamente para conocer detalladamente sus propiedades y al mismo tiempo buscar aplicaciones (13,67,68). Estas lectinas han demostrado ser herramientas útiles en técnicas de cromatografía de afinidad para la purificación de glucoproteínas solubles y membranales (14,33,44,53). Por sus propiedades se ha utilizado extensivamente para el estudio genético (4,26,30), también se han introducido en una gran gama de estudios y de investigaciones que se enumeran en el cuadro # 5.

A pesar de que se desconoce el papel fisiológico que poseen las lectinas en la naturaleza, la aplicación de estas proteínas en distintas áreas de la medicina, la biología molecular o la inmunología entre otras, se ha hecho de uso frecuente (9,20,67). Las ventajas que ofrecen las lectinas en contraste con la utilización de otros reactivos, como los anticuerpos son: en primer lugar, las lectinas pueden obtenerse fácilmente en grandes cantidades; en segundo lugar, el complejo que forman las cadenas glucoproteicas con la lectina puede ser disociado con monosacáridos y por último la disociación puede efectuarse a un pH neutro sin causar daños graves a la estructura o actividad biológica de la glucoproteína en cuestión (33,53,63,67).

Probablemente con el paso del tiempo durante su análisis y el descubrimiento de nuevas variedades de lectinas se vayan conociendo muchos más efectos y aplicaciones.

USOS DE LAS FITOHEMOAGLUTININAS

Cuadro # 5.- Algunos usos de las fitohemoaglutininas en biomedicina (67,68)	
REFERENCIAS	
a) Utilizado para clasificar algunos mamíferos filogenéticamente	(7,13)
b) Estudio de cromosomas humanos	(3,31,68)
c) Tipificación de grupos sanguíneos en varios mamíferos	(7,24,67)
d) Para detectar alteraciones de linfocitos en algunas enfermedades	(3,19,37)
e) Medir vida media de los linfocitos	(3,17,18,19,68)
f) Estudio de la esterilidad reproductiva de diversas especies	(26,33,67)
g) Algunos defectos genéticos	(3,14,17,67)
h) Util en el diagnóstico prenatal de malformaciones	(3,31,68)
i) Utilizado en problemas de Aborto habitual	(31,33,67)
j) Caracterización de glucoproteínas de la membrana de los eritrocitos	(3,18,34,37,54)
k) En estudios médicos forenses para identificar sangre y diferentes sangres de animales	(7,33)
l) En la purificación y caracterización de polisacáridos y glucoproteínas específicas en sueros normales	(28,34,37,67)
m) Estimulación de la división de linfocitos en reposo y diferenciación	(18,19,37,67,68)
n) Puede ser utilizada para la clasificación de diferentes tipos de leucemias	(9,19,37,)
o) Algunas lectinas se han utilizado en el estudio del crecimiento de células tumorales <i>in-vitro</i> o <i>in-vivo</i>	(1,16,53,55,67)
p) Identificación de células transformadas después de una infección viral	(37,38,54,55,67)
q) Para identificar algunas alfa-fetoproteínas	(3,31,54,67)

3.- METODOS DE EXTRACCION (31,39,43)

Para realizar una extracción y purificación se parte de fuentes naturales, planteando la posición de la proteína dentro de la célula y así lograr una extracción tratando de disminuir los pasos para eliminar contaminantes.

METODOS: (34,40)

La obtención de proteína puede ser de origen Vegetal, Animal o de cualquier microorganismo (bacteria, hongo, virus, etc.)

Medios Físicos: Ruptura de la pared celular y la membrana celular por:

- a) Molinos
- b) Sonicación o Ultrasonicación
- c) Tratamiento térmico
- d) Tratamiento Osmótico

Medios Químicos:

- a) Detergentes
- b) Solventes orgánicos
- c) Enzimas: lisozimas y papaína

En células vegetales la ubicación de la proteína es importante ya que la ruptura de la membrana libera ácidos fenólicos, los que se unen a proteínas, por lo que hay que controlar el pH

para evitarlo (9); a diferencia de cuando se encuentra en los organelos en que es suficiente una centrifugación (43,44).

Para la obtención de proteínas es fundamental seguir una serie de pasos, considerando las propiedades de solubilidad, carga, tamaño, actividad biológica; y una combinación, para la separación de otras biomoléculas en presencia de un grupo de proteínas (6,39). La separación por solubilidad se logra modificando el pH, la fuerza iónica, las propiedades dieléctricas del solvente y la temperatura.

El pH permite eliminar algunos contaminantes que entorpecerían la purificación. Una proteína es menos soluble a pH isoeléctrico ya que la molécula no tiene carga neta por lo que no hay repulsión electrostática y tienden a aglutinar y a precipitar (12,43). El pH depende de la fuerza iónica de la solución y más aún de la composición iónica.

La fuerza iónica.- Las sales con pKa cerca de 7.2 influyen en la solubilidad a concentraciones bajas, las sales presentes aumentan la solubilidad, esto se debe a cambios posiblemente en la tendencia de los grupos "R" disociables a ionizarse en la proteína (40). A medida que la concentración de la sal aumenta la solubilidad de la proteína disminuye y, cuando la fuerza iónica es suficiente llega el momento que la proteína precipita. La sal captura agua de hidratación de la molécula de proteína reduciendo la solubilidad (50). El rango de concentración en el cual precipita depende de la naturaleza de la proteína, de la sal añadida, la temperatura sobre la solubilidad es muy variable. Las globulinas de semillas de plantas son más solubles en soluciones salinas a temperaturas más altas que a temperaturas más bajas (13,27,40).

Las propiedades dieléctricas del solvente.- La adición de solventes orgánicos como el etanol

y la acetona disminuyen la solubilidad en agua de la mayoría de las proteínas globulares, lo que lleva a una precipitación. Manteniendo el pH y la fuerza iónica constantes, nos permite indicar que la solubilidad depende de la constante dieléctrica por ejemplo, cuando se adiciona etanol con una constante más baja que la del agua a una solución acuosa de proteína, aumenta las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y puede disminuir el grado de ionización de los grupos "R" de la proteína agregándose y precipitando (40). Con este método es fácil provocar la desnaturalización de la proteína por lo que es mejor realizarla a bajas temperaturas (42).

Temperatura.- El calor de la desnaturalización de las proteínas tiene un gran coeficiente de temperatura en consecuencia, su destrucción por este factor (que es diferente y característico de cada una) está muy definido (39,44).

Se debe considerar la propiedad de ionización de la proteína, en cada molécula hay un número de grupos que pueden disociar o unir protones formando aniones o cationes confiriéndoles propiedades ácido - base características.

Los métodos de separación y análisis basándose en estas propiedades ácido - base son Electroforesis y Cromatografía de intercambio y absorción (16,43).

Electroforesis.- La conducta de una macromolécula en un campo eléctrico es dada por la movilidad, carga eléctrica y el coeficiente de fricción (2). Cuando se somete a un campo eléctrico "E" una partícula aislada suspendida en un perfecto aislante, habrá una fuerza QE (donde Q es la carga neta de la partícula) sobre ella y cuando se desplaza habrá una fuerza de fricción $f(dx/dt)$ que actuará en dirección opuesta donde "f" es el coeficiente de fricción y dx/dt es la velocidad de la partícula

(34,43). Los métodos de electroforesis que más se usan se clasifican en:

- a).- Electroforesis en un medio uniforme de pH, en la que la separación está basada en las diferencias de carga de los componentes individuales a determinado pH.
- b).- Electroenfoque, que se basa en las diferencias de los puntos isoelectricos de las proteínas y en el que la separación se lleva a cabo en presencia de un gradiente de pH.
- c).- Electroforesis en un medio con tamiz molecular, es usada como soporte en una electroforesis de zona y es de gran ayuda utilizándose en presencia de detergentes de amoníaco que al anular la carga de las proteínas llevan a cabo la separación solo por tamaño.
- d).- Isotacoforesis, es la separación de los iones en base a su movilidad neta, ya que todos migran a la misma velocidad.

Un caso especial es la inmunoelectroforesis, que aprovecha la propiedad antigénica de las proteínas que pueden ser determinantes en la caracterización y la cuantificación de las mismas (39,52,54).

Los métodos de Cromatografía más utilizados se clasifican en (52,55) :

Cromatografía de intercambio iónico.- La fase estacionaria consiste en un material sintético, polimerizado generalmente de básicos depende del tipo de resina. Cuando los grupos fijos son positivos, los iones cambiabiles son negativos y viceversa. Es decir si los grupos químicos cargados

fijos son positivos y la solución de intercambio tiene iones negativos la resina se llama aniónica y cuando la resina tiene cargas fijas negativas y la solución de intercambio posee cargas positivas se le denomina catiónica (33,50,55,).

La fase móvil está compuesta por un gradiente de elusión que puede ser lineal o de otras clases. Este tipo de cromatografía puede combinarse con la cromatografía de exclusión molecular, que resuelve las mezclas de proteínas con base a su carga y tamaño. Como la de CM-Sephadex usada por Lawrens,1969 (34,55)

Cromatografía de exclusión molecular.- Comprende una fase móvil (líquida o gaseosa), y otra estacionaria (sólido o líquido) que hacen contacto a través de las cuales son transportados los componentes de una mezcla a diferentes velocidades dependiendo de sus afinidades relativas para las dos fases 40,43).

Absorción.- Las proteínas pueden ser absorbidas con materiales relativamente inertes (carbón, alúmina, gel de sílice, hidroxapatita, etc.) y después elu-ídas selectivamente. La naturaleza es unión se desconoce pero se supone participación de fuerzas de Van der Waals e interacciones de tipo iónico en el caso de absorbentes no polares y atracciones de tipo iónico en el caso de absorbentes de tipo polar (16,40,54).

Por el gran tamaño de las proteínas se diseñaron métodos para separar las moléculas de tamaño pequeño, tales como: Diálisis y ultrafiltración, centrifugación y cromatografía de exclusión molecular.

Diálisis y ultrafiltración.- Utilizan membranas semipermeables de poro controlado (40,43).

La diálisis se emplea para eliminar la sal de una solución proteica es decir, el equilibrio de una solución proteica con una tamponada quedando retenidas las proteínas, saliendo las moléculas de menor peso molecular. Es de importancia cuando se utiliza a continuación de la fase en la cual tuvo lugar la precipitación de la proteína (43).

Centrifugación en equilibrio.- Cuando se somete una partícula a un campo centrífugo experimental su fuerza es directamente proporcional a su masa, a su vez está contrarrestada por la tendencia que tiene la partícula a flotar, causada por el desplazamiento del solvente y por la fuerza de fricción hasta que se alcanza un equilibrio de flujos en que la velocidad de sedimentación es constante, dando un coeficiente de sedimentación que guarda una relación con el peso de la proteína (18,40). Existen otros tipos de centrifugación donde se incluyen algunos solutos como en el caso de gradientes de glucosa, Cloruro de Cesio y otros.

El método basado en la propiedad biológica de algunas proteínas de tener capacidad específica y activarse para unirse a una molécula llamada "ligando" se denomina cromatografía de afinidad. El complejo de proteína obtenido denominado ligando - soporte, se disocia para extraer la proteína suficiente a través del método de purificación usado por Felsted y Leavitt para la PHA en 1975 (21).

Cromatografía líquida.- En este método la fase móvil es líquida y la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido que cubra un soporte sólido (52). Los principios de distribución entre las fases son la absorción en la superficie, el intercambio iónico, las solubilidades relativas y los efectos estéricos (52). Finalmente, se puede afirmar que debido a la funciones de la PHA en las plantas como por sus propiedades en los animales y microorganismos ya antes mencionados, las lectinas son de gran interés y utilidad para diferentes estudios (34,53).

4.- JUSTIFICACION

En anteriores trabajos se ha reportado que la actividad hemoaglutinante varía no solamente cuando se prueba con eritrocitos de diferentes especies sino también dicha actividad es diferente dependiendo de la lectina que se utilice así como entre las variedades de un mismo género (11,13,44), encontrando que el frijol negro es más activo mitogénicamente, como hemoaglutinante (67,68) por lo que se elige utilizarlo en este trabajo.

Además de ser de gran utilidad en el laboratorio para las técnicas de citogenética para realizar Cariotipos (38,67). Se pueden estudiar técnicas de extracción de la proteína fitohemoaglutinina obtenida de *Phaseolus vulgaris* común (frijol negro) a un costo muy bajo, y que reporte una actividad comparable a un producto comercial.

Puesto que la obtención de la fitohemoaglutinina se puede realizar durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* es importante analizar el comportamiento de las actividades de la PHA durante el crecimiento que de la planta y buscar un modelo que nos permita entender este comportamiento y observar como durante el proceso de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* estos cambios podrían explicar la regulación génica para el crecimiento de la planta.

OBJETIVO:

EVALUAR LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LA FITOHEMOAGLUTININA OBTENIDA DURANTE LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO DE *Phaseolus vulgaris*.

HIPOTESIS:

SI LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE O MITOGENICA ESTAN RELACIONADAS CON LAS ETAPAS DE DESARROLLO DE LAS LEGUMINOSAS, ENTONCES PODRAN IDENTIFICARSE LOS CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LA FITOHEMOAGLUTININA OBTENIDA DURANTE LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO DE *Phaseolus vulgaris*.

III.- MATERIAL Y METODOS

1.- Extracción de la Fitohemoaglutinina

2.- Cuantificación de Proteínas

3.- Actividad hemoaglutinante y mitogénica

4.- Análisis de resultados

METODOLOGIA

La metodología que se llevó a cabo consistió en los puntos siguientes:

1.- Extracción: A partir de frijol negro que se tritura finamente, se mezcló con la mínima cantidad de buffer hasta obtener una mezcla homogénea, en una proporción de 20 gramos de harina en 200 ml de buffer, siguiendo el método modificado de extracción (13,57). Las muestras de las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*, primero induciendo la germinación en medio húmedo y tomando muestras en tres etapas de la germinación: a los 2 días, 4 días y 10 días, posteriormente se tomaron nuevamente muestras a la planta completa a los 60 días de desarrollo, cuando está por nacer el ejote, para tomar tres muestras durante el crecimiento del ejote hasta la maduración y finalmente a la obtención de la semilla seca y madura. Las muestras de germinación, se extrajeron con la misma técnica (17,24,31), al igual que las muestras de ejotes que se cosechan. Todas las muestras obtenidas se colectaron en frascos color ámbar y se guardaron en el congelador para efectuarles las pruebas de cuantificación de proteínas y actividad hemoaglutinante y mitogénica.

2.- Cuantificación de Proteínas: A los extractos obtenidos se les realizaron las pruebas de: Cuantificación de proteínas (6,18), utilizando el método de Biuret y basándonos en una curva estándar de Albúmina-bovina fracción V, para proteínas.

3.- Actividad hemoaglutinante y mitogénica: A cada una de las muestras obtenidas se les evaluaron la actividad hemoaglutinante (3,19) y actividad mitogénica (31,47); de acuerdo a diversos autores (3,13,19,31,47)

4.- Análisis de Resultados: La linearización de la curva estándar de proteínas se realizó mediante regresión lineal con el paquete NWA Estatpak para P C. (38). Se analizaron los resultados mediante pruebas de regresión con: una ecuación lineal, exponencial, logarítmica, de potencia y cuadrática (38), para buscar el modelo que mejor explique el comportamiento de las diferentes concentraciones de proteínas, actividad hemoaglutinante y mitogénica en relación con las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*. (38).

1.- EXTRACCION DE LA FITOHEMOAGLUTININA (13,17,57).

REACTIVOS	MATERIAL
	Molino de mano
	Tamices #20 y #80
NaCl al 0.9 %	Mortero
HCL 0.1 N	Agitador Magnético
NaOH 0.1 N	pH metro
Harina de frijol	Centrífuga Clínica
Buffer de Fosfatos 0.1 M	Termómetro
pH 7.4	Ultracentrífuga Ependor

Método Modificado (13,37,40).

A partir de frijol negro que se tritura con un molino de mano, se realizó un tamizado a modo de obtener una harina en tamiz # 20 y # 80, a continuación se mezcló 20 g con mínima cantidad de NaCl a 0.9% hasta lograr una masa homogénea (durante 2 horas aproximadamente), luego se resuspendió en solución Buffer de Fosfato a pH 7.4 en una proporción de 20 gramos de harina en 200 ml de buffer, y se mantuvo agitando durante 24 hrs. a una temperatura de 4°C.

Al siguiente día se centrifugó a 3000 X g durante 30 minutos, el sobrenadante se centrifugó en centrífuga Ependor por 15 minutos a 15000 X g obteniendo un sobrenadante transparente. Finalmente se colectó el sobrenadante y se guardó en frascos ámbar bien tapados y etiquetados.

A este sobrenadante se le cuantificó cantidad de proteína mediante una curva estándar de proteínas y se le midió la actividad Hemoaglutinante y Mitogénica (13,40).

Todas las muestras de las diversas etapas de crecimiento se obtuvieron con el mismo método y se colectaron y guardaron bien tapadas y etiquetadas.

Esquema # 2.-METODO MODIFICADO DE EXTRACCION DE LA
FITOHEMOAGLUTININA

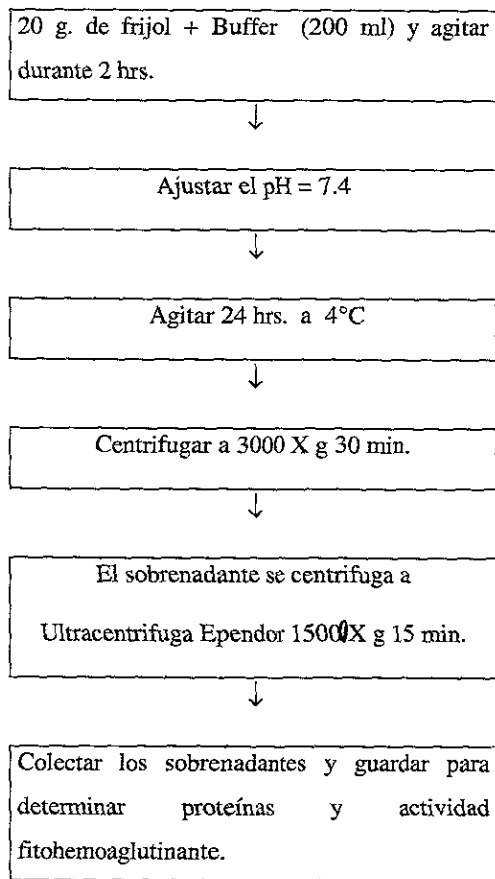


Diagrama de flujo de extracción de la Fitohemoaglutinina, método modificado (17,57)

2.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS por Método de Biuret (6,18).

FUNDAMENTO: En medio moderadamente alcalino más Cu^{2+} se forma un complejo con C=O y $=\text{N-H}$, reacción que ocurre con compuestos que por lo menos contienen dos grupos $\text{NH}_2\text{CO-}$, $-\text{NH}_2\text{OS-}$ dando un color que absorbe a 540 nm. (18, 50)

REACTIVOS	MATERIAL
- BIRUET (1 litro)	
KI 1 gramo	Baño María
NaOH 0.25 N 300 ml	Material de Vidriería
$\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 1.5 gramos	Termómetro
Tartrato de Na y K 6 gramos	H_2O Bidestilada
- NaCl al 0.09 %	Espectrofotómetro
- Solución estándar de Albúmina-bovina fracción V.	

METODO:

Se preparó el reactivo de Biuret para trabajar. Después se hizo una curva de calibración para proteínas; la curva estándar se preparó con Albúmina Bovina fracción V.. La concentración de la solución es 1 mg/ml de albúmina. Con esta solución se preparó una serie de tubos como se muestra en el cuadro de la curva estándar de proteínas. (ver cuadro siguiente).

Estos tubos se colocaron en baño María y se dejaron incubar 30 min. a 37°C.

CURVA ESTANDAR DE PROTEÍNAS

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sol Estándar Alb- bovina										
fracc. V (ml)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0
NaCl 0.9 %										
(ml)	2.3	2.1	1.9	1.7	1.5	1.3	1.1	0.9	0.7	0.5
Reactivo Biuret										
(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Posteriormente se tomaron las lecturas de Absorbancia a 540 nm. Para realizar la gráfica patrón de la solución estándar de proteínas (ver fig. # 1)

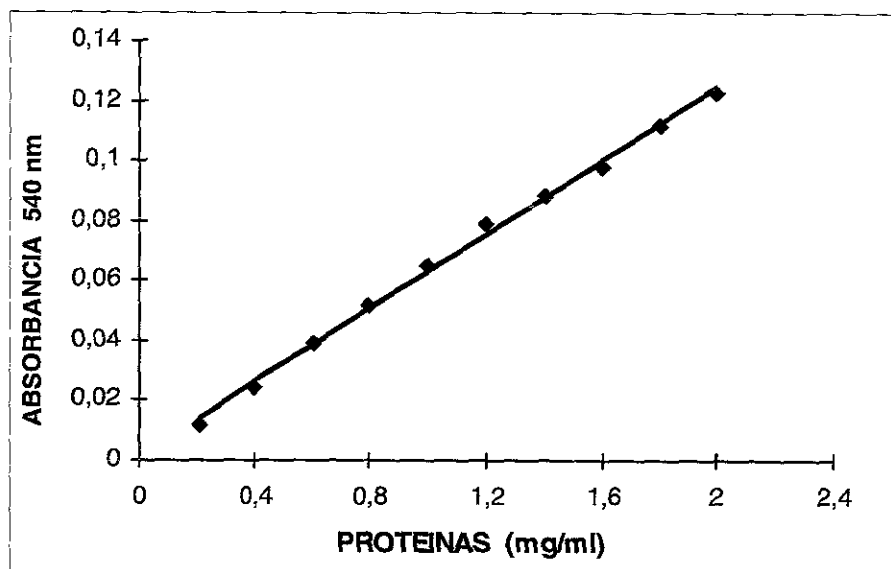
Todos los tubos problemas se prepararon con 0.2 ml de los sobrenadantes mas 2.3 ml de NaCl al 0.9 %, mas 2.5 ml de reactivo de Biuret, trabajándolos en las mismas condiciones que las muestras anteriores.

Cuadro # 7.- DATOS DE LA CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS

TUBOS	Albúmina-bovina (mg/ml)	Lectura promedio a 540 nm
1	0.2	0.012
2	0.4	0.024
3	0.6	0.040
4	0.8	0.053
5	1.0	0.065
6	1.2	0.079
7	1.4	0.088
8	1.6	0.098
9	1.8	0.112
10	2.0	0.123

Curva estándar de proteínas, utilizando una solución de Albúmina-bovina fracción V, 1 mg/ml. Cuantificados por método Biuret, incubados 30 min. A 37°C, y leídas a 540 nm.

FIGURA # 1.- CURVA ESTANDAR DE PROTEINA



Linearización de la curva estándar de proteínas por el paquete estadístico NWA Estatpak para P. C (38). Con un valor $r = 0,99845$.

3.- ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE (7,17)

FUNDAMENTO: Tomando en cuenta las propiedades que tienen las fitohemoaglutininas de aglutinar glóbulos rojos, se decide utilizar sangre de tipo "O" Rh positivo, de acuerdo a estudios previos (7,17,47).

REACTIVOS

- Sangre Heparinizada Tipo "O"+
- Sol. NaCl 0.09 %
- Muestras de sobrenadantes

MATERIAL

Baño María
Termómetro
Material de vidriería
Tubos de ensayo en gradillas

METODO:

Se tomó la cantidad necesaria del sobrenadante de fitohemoaglutinina para obtener una concentración de 1 mg en 1 ml de solución. Salina. A continuación se tomaron 0.25 ml y se prepararon en series de tubos con diluciones dobles, quedando las diluciones como siguen: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512, por último se agregaron 0.25 ml de solución de glóbulos rojos a una concentración final de 10,000 células/ml. Se dejó incubar 30 min. a 37°C.

Después del tiempo establecido se observó la aglutinación. Se consideró el recíproco de la lectura de dilución más baja donde se presentó hemoaglutinación, para obtener el título de hemoaglutinación.

Actividad Mitogénica: (31,47)

Para cuantificar la actividad mitogénica se tomó el extracto de Fitoheмоaglutinina en una dilución 1:20 y se probaron en frascos para cultivo de linfocitos, que se extraen mediante la solución de Ficolly pack.(3,15,31,47).

MATERIAL:

Frascos limpios estériles

Medio de cultivo HAM F - 10

Mezcla de Antibióticos: Estreptomicina y Penicilina Procafnica

Sangre Heparinizada tipo "O"

Solución de colchicina

Solución de KCl 0.75 M a 37 °C

Solución Etanol-Acido Acético 2:1

Estufa a 37 °C

Centrifuga Clínica

Bomba de vacío para aspirar

Agitador Vortex

Porta objetos limpios desengrasados y fríos

Los frascos de cultivo se prepararon en Campana estéril con la siguiente composición:

Medio de cultivo HAM F-10	8 ml
Dilución de Fitoheмоaglutinina	0.3 ml
Mezcla de antibióticos	1 gota
Sangre entera heparinizada	10 gotas

- Los frascos se mezclaron y se dejaron en la estufa a 37 °C durante 72 horas: cuando cumplieron 70 horas se agregaron a cada frasco 1 gota de colchicina y se dejaron terminar las 72 hrs.

- Se sacaron los frascos de la estufa, transfiriendose a tubos de centrifuga y se pusieron a centrifugar a 3 000 X g por 10 min.

- Se retiró el sobrenadante por aspiración.

- Se resuspendieron con 8 ml de solución KCl 0.75 M a 37 °C, incubándolos en la estufa por 25 min. a 37 °C Se centrifugaron por 5 min. a 3 000 X g y se desecharon los sobrenadantes.

- Se resuspendieron en Vortex y en agitación constante se agregaron 8 ml. de solución Etanol-Acido Acético fría, evitando que se formen grumos.

- Se dejó actuar por 30 min. a Temperatura Ambiente y se centrifugaron 5 min. a 3 000 X g.

- El sobrenadante se resuspendió y por goteo se fijaron en portaobjetos limpios y fríos, donde se forma una pequeña película que nos permite leer metafases en el total de células.

- Las laminas fijadas se tiñen en solución de Giemsa.

- La actividad mitogénica se midió por el número de metafases observadas en un total de 1000 células.

4.- Análisis de Resultados:- Los resultados se analizaron mediante pruebas de regresión con una ecuación lineal, exponencial, logarítmica, de potencia y cuadrática para determinar el modelo que mejor explique el comportamiento de concentración de proteína, actividad hemoaglutinante y mitogénica en relación con las diversas etapas de desarrollo del *Phaseolus vulgaris*, (38).

IV.- RESULTADOS

- 1.- Proteínas totales
- 2.- Actividad hemoaglutinante y mitogénica
- 3.- Comparación de Proteínas y Actividad hemoaglutinante y mitogénica
- 4.- Análisis de la correlación de resultados

IV.- RESULTADOS

Se obtuvieron ocho extractos de fitohemoaglutinina durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*. En el cuadro # 7 se muestran las etapas de crecimiento y los días de edad correspondientes a los cuales se colectaron las muestras para este estudio.

Etapa 0 semilla seca y almacenada por mucho tiempo

Etapa 2 germinación a los 2 días en humedad

Etapa 3 germinación a los 4 días, estado de plántula

Etapa 4 a los 10 días cuando la planta esta completa como tal



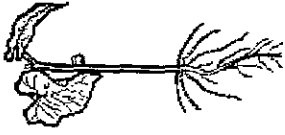
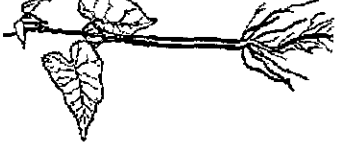
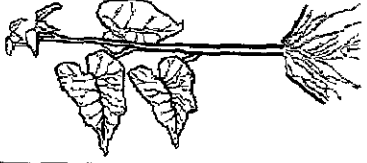



Etapa 5 a los 60 días la planta esta en proceso de floración, para iniciar el brote de ejotes

Etapa 6 a los 78 días el ejote se encuentra a la mitad de crecimiento y maduración

Etapa 7 son 100 días el ejote se encuentra maduros para su recolección y aprovechamiento

Etapa 8 a los 127 días ya se recolectó las vainas maduras de frijol y pasaron el proceso de secado, la semilla esta madura y aun no totalmente seca

CUADRO # 7.- LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO *Phaseolus vulgaris*.

E t a p a s	semilla	germinación	plántula	planta	floración	ejote mediano	ejote maduro	semilla seca cosechada	Días
									0
									2
									4
									10
									60
									78
									100
									127

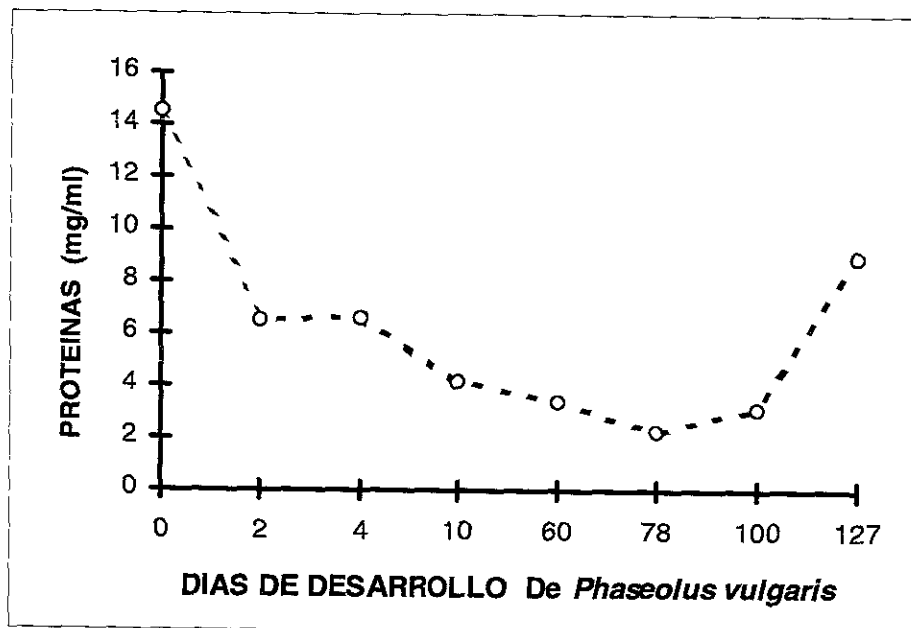
1.- PROTEINAS TOTALES:

La cuantificación de proteínas se hizo por triplicado en cada extracto y se reporta el promedio de 3 determinaciones (\bar{X}), estos resultados se muestran en la tabla # 1 y en la gráfica # 1. Se observa que las concentraciones mas altas se obtienen en las semillas.

Tabla # 1. PROTEINAS TOTALES durante las diversas etapas de desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	
Desarrollo <i>P. v.</i> días	\bar{X} Proteínas (mg/ml)
0	14.50
2	6.50
4	6.65
10	4.15
60	3.35
78	2.25
100	3.10
127	9.00

Cuantificación de proteínas totales de los diferentes sobrenadantes en las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* reportada como \bar{X} promedio de 3 cuantificaciones, por método de Biuret.

GRAFICA # 1.- PROTEINAS TOTALES DURANTE LAS
DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO De *Phaseolus vulgaris*.



Cuantificación de proteínas en los sobrenadantes de las diferentes etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*.

2.- ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE Y MITOGENICA

Los resultados de la comparación de la actividad hemoaglutinante y mitogénica se muestran en la tabla # 2 y en las gráficas # 2 y # 3, observando variaciones en algunos puntos.

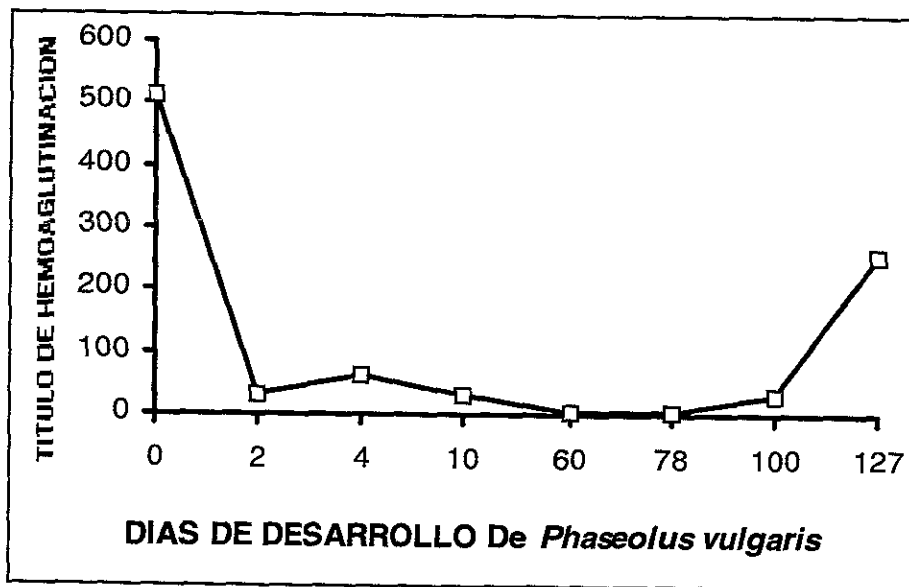
Tabla # 2.- COMPARACION DE LA ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE Y MITOGENICA De Fito-hemoaglutinina durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*.

Desarrollo <i>Phaseolus vulgaris</i> (días)	Actividad Hemoaglutinante Título de Hemoaglutinación (H. A.)	Actividad mitogénica No. Metafases/1000
0	512	80
2	32	120
4	64	86
10	32	68
60	2	102
78	2	
100	32	
127	256	* ≈ 55

Cuantificación de la actividad hemoaglutinante con glóbulos rojos de sangre humana tipo O Rh positivo. El título de hemoaglutinación se consideró como el recíproco de la dilución más baja utilizada en la que se observó hemoaglutinación. y la actividad mitogénica en linfocitos de sangre humana tipo O positivo; determinada por el número de metafases observadas en 1000 células.

* Considerando el valor que corresponda en el día 127, de acuerdo a los valores obtenidos en el día 0 que pueden ser parecidos.

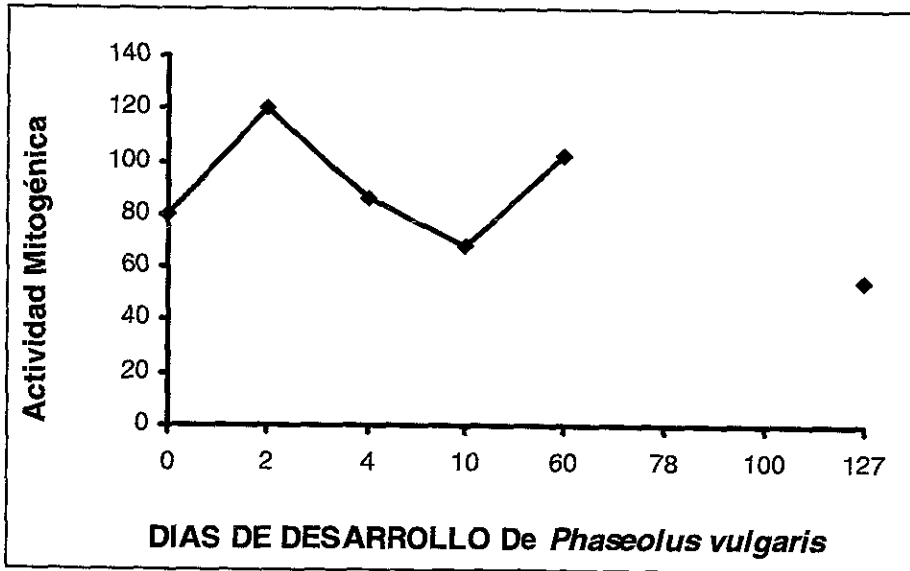
GRAFICA # 2.- ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE DE LA
 FITOHEMOAGLUTININA DURANTE LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO
 De *Phaseolus vulgaris*.



Cuantificación de Actividad Hemoaglutinante. El título de hemoaglutinación se consideró como el recíproco de la dilución más baja utilizada en la que se observó hemoaglutinación.

GRAFICA # 3.- ACTIVIDAD MITOGENICA DE LA FITOHEMOAGLUTININA

DURANTE LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO DE *Phaseolus vulgaris*.



Cuantificación de la Actividad mitogénica de la fitohemoaglutinina, determinada por el número de metafases observadas en 1000 células.

3.- COMPARACION DE PROTEINAS Y ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE Y
MITOGENICA

Los resultados de la comparación de Proteínas, actividad hemoaglutinante y mitogénica se muestran en la tabla # 3 y en la gráfica # 4 se observa su comportamiento global.

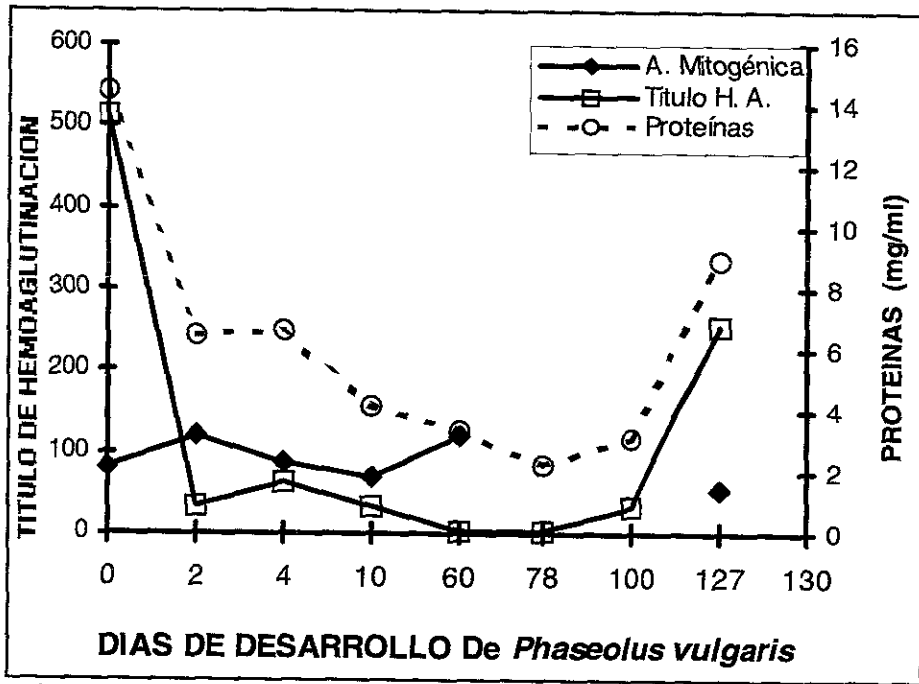
TABLA # 3.- COMPARACION EN LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO De
Phaseolus vulgaris: Cuantificación de Proteínas: Actividad Hemoaglutinante y Actividad
Mitogénica de la fitohemoaglutinina.

Desarrollo <i>Phaseolus v</i> (días)	\bar{X} Proteínas (mg/ml)	Título de Hemoaglutinación (H.A.)	Actividad mitogénica No. metafases/1000
0	14.50	512	80
2	6.50	32	120
4	6.65	64	86
10	4.15	32	68
60	3.35	2	102
78	2.25	2	
100	3.10	32	
127	9.00	256	* ≈ 55

Comparación de resultados de proteínas totales, actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica de la fitohemoaglutinina obtenida durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*.

* Considerando el valor que corresponda en el día 127, de acuerdo a los valores obtenidos en el día 0 probablemente puede ser parecido.

GRAFICA # 4.- COMPARACION DE PROTEINAS TOTALES Y ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE Y MITOGENICA DE LA FITOHEMOAGLUTININA OBTENIDA EN LAS DIVERSAS ETAPAS DE DESARROLLO De *Phaseolus vulgaris*



Comparación de la cuantificación de proteínas totales, actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica de la fitohemoaglutinina obtenida durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*.

4.- ANALISIS DE LA CORRELACION DE RESULTADOS

El análisis de regresión para la correlación de resultados se muestran en las tablas # 4, 5,6 y 7

TABLA # 4.- RESULTADOS del ajuste de los modelos de regresión a la relación entre los días de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* y la concentración de Proteínas Totales

Tipo de modelo	Ecuación de la curva	r^2	a	b	c
Lineal	$y = a + bx$	-0.3125	7.3826	-2.5087	--
Exponencial	$y = ae^{(bx)}$	-0.3465	6.3859	-4.2522	--
De Potencia	$y = ax^b$	-0.7057	8.0735	-0.1750	--
Logarítmica (ln)	$y = a + b(\ln x)$	0.4857	11.5	-4.008	--
Logarítmica (log)	$y = a + b(\log x)$	-0.7412	9.1908	-1.2025	--
Cuadrática (parabólica)	$y = a + bx + cx^2$	0.8785	19.723	-6.7149	0.6542

El que mejor se ajusta es el modelo de la ecuación cuadrática, ecuación de la parábola, es decir que la concentración de proteínas con respecto a los días de desarrollo tiene el comportamiento de una parábola; la ecuación ajustada fue:

$$y = 19.723 - 6.1749x + 0.6542 x^2$$

$$r^2 = 0.8785$$

TABLA # 5.- RESULTADOS Del ajuste de los modelos de regresión para la relación entre los días de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* y Título de Hemoaglutinación.

Tipo de modelo	Ecuación de la curva	r^2	a	b	c
Lineal	$y = a + bx$	-0.1217	133.183	-0.4342	--
Exponencial	$y = ae^{(bx)}$	-0.1640	43.6046	-0.00649	--
De Potencia	$y = ax^b$	-0.5393	94.0111	-0.4315	--
Logarítmica (ln)	$y = a + b(\ln x)$	0.3154	306.79	-143.55	--
Logarítmica (log)	$y = a + b(\log x)$	-0.6110	226.53	-44.057	--
Cuadrática (parabólica)	$y = a + bx + cx^2$	0.7828	676.93	-295.62	30.19

El que mejor se ajusta es el modelo de la ecuación cuadrática; ecuación de la parábola, es decir que el título de hemoaglutinación con respecto a los días de desarrollo tiene el comportamiento de una parábola, la ecuación ajustada fue:

$$y = 676.93 - 295.62x + 30.19x^2$$

$$r^2 = 0.7828$$

TABLA # 6.- RESULTADOS Del ajuste de los modelos de regresión para la relación entre los días de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* y Actividad Mitogénica

Tipo de modelo	Ecuación de la curva	r^2	a	b	c
Lineal	$y = a + bx$	0.2209	88.516	0.1765	--
Exponencial	$y = ae^{(bx)}$	0.2503	86.546	-0.00217	--
De Potencia	$y = ax^b$	0.2064	100.63	-0.1738	--
Logarítmica (ln)	$y = a + b(\ln x)$	0.1625	99.932	-12.902	--
Logarítmica (log)	$y = a + b(\log x)$	--	--	--	--
Cuadrática (parabólica)	$y = a + bx + cx^2$	0.3897	86.067	6.2306	-1.2497

No se encontró un modelo adecuado que explique el comportamiento de la actividad mitogénica.

TABLA # 7.- RESULTADOS del análisis de correlación para determinar la relación entre concentración de proteínas y título de hemoaglutinación durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*.

Tipo de distribución	Ecuación de la curva	r^2	a	b
Lineal	$y = a + bx$	0.95024	-144.81	42.232
De Potencia	$y = ax^b$	0.8911	0.2770	2.8756
Exponencial	$y = ae^{(bx)}$	0.8495	2.3944	0.4190
Logarítmica	$y = a + b(\log x)$	0.8473	-290.38	246.37

La ecuación que muestra la mejor relación entre la concentración de proteínas y el título de hemoaglutinación es la lineal, es decir muestra una relación lineal entre la concentración de proteínas y la actividad hemoaglutinante.

V.- DISCUSION

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de *Phaseolus vulgaris* indican que conforme comienza su desarrollo embrionario la cantidad de proteína/gramo de tejido disminuye y produce un decremento significativo alrededor del día 10 (ver cuadro # 7), que es cuando se encuentra en estado de plántula. Dado que la proteína se encuentra distribuida en diferentes porcentajes en toda la planta (9,11,34), cuando la planta esta creciendo en algunos sitios es más fácil de extraer y en otros no, ya que este decremento se mantiene hasta el día 78 que es en la etapa que se encuentra creciendo el ejote y que se podría pensar que la semilla está restableciendo sus reservas para comenzar nuevamente el ciclo de germinación. Durante la maduración y crecimiento del ejote la síntesis de proteínas esta en auge y va ir aumentando cada vez. Este comportamiento corresponde al modelo que explica la tendencia que sigue la gráfica de cuantificación de proteínas (gráf. # 1), que es de tipo parabólica analizada en la tabla # 4, posteriormente alrededor de los días 80 se ve una tendencia de aumentar llegando a el día 127 a un nivel de 9.00 mg., y posiblemente llegará a recuperar los valores iniciales.

Observando que la mayor concentración de proteína se obtiene en las semillas, la inicial y las finales. Cabe mencionar que las cantidades en gramos de proteínas pueden sufrir variaciones, porque las muestras obtenidas en cada etapa después de la germinación contienen mayor cantidad de agua que la semilla inicial sola.

Los diferentes extractos de Fitoheмоaglutinina fueron cuantificados para medir su actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica, obteniendo los siguientes resultados (ver tabla # 2):

En la gráfica de actividad hemoaglutinante (gráf. # 2), observamos que la actividad de

hemoaglutinación disminuye desde el día 2 durante su período de desarrollo embrionario (cuadro # 7) y se mantiene a la baja hasta el día 78 que es cuando se encuentra creciendo el ejote, posteriormente se observa un aumento en la actividad hemoaglutinante, mostrando un valor alto al día 127 y con una tendencia de alcanzar el valor inicial. El comportamiento de la gráfica de actividad hemoaglutinante (gráf. # 2), es de tipo parabólico y corresponde al modelo que explica la tendencia que sigue la curva y que se analizó en la tabla # 5.

Mientras que el valor de actividad mitogénica el día 2 (cuadro # 7), etapa de desarrollo embrionario, se ve aumentado considerablemente, posteriormente sufre una disminución paulatina hasta el día 10 y el día 60 una nueva tendencia a aumentar esta actividad (gráf. # 3), aunque finalmente no se cuantificó en las últimas etapas, por falta de recursos, tampoco se tuvieron las repeticiones necesarias y no fue posible realizar un análisis estadístico (ver tabla # 6)

Al realizar la comparación de la actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica, observamos que mientras en algunos puntos (día 2 y 60), la actividad hemoaglutinante disminuye la actividad mitogénica se incrementa, en otros puntos se mantiene y que la diferencia entre los valores no es significativa, esto nos permite inferir la presencia de diferentes fracciones de la fitohemoaglutinina que tienen actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica (18,20,35,68) y que la actividad depende del tipo de células y del período en que se encuentre dicha célula (6,33).

Posteriormente en la tabla # 3 donde se integran todos los resultados obtenidos en esta experimentación; nos permite observar en forma global el comportamiento de la fitohemoaglutinina durante el período de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*. Se puede corroborar que en etapas con poca síntesis proteica celular hay poca actividad hemoaglutinante y actividad mitogénica, mientras que en otros puntos hay un incremento (gráf. # 4). La actividad mitogénica presenta un pico de mayor

actividad en el día 2 (cuadro #7) cuando se esta llevando a cabo la germinación y que hay síntesis proteica y presenta un nuevo pico el día 60 que es cuando la planta esta en proceso de floración, es cuando nace el ejote o bien un nuevo periodo de crecimiento o de mayor síntesis proteica durante el desarrollo del *Phaseolus vulgaris*; mientras la actividad hemoaglutinante mantiene un valor bajo al igual que la concentración de proteínas.

Para utilizar esta Fitoheмоaglutinina en el Laboratorio para las técnicas de Citogenética es mejor obtener el extracto durante el primer periodo en proceso de germinación o en los últimos días de crecimiento de la planta. Algunas muestras comparadas con un producto comercial dieron resultados semejantes y podría pensarse que puede ser sustituido.

Se mostró que la relación entre concentración de proteína y el título de hemoaglutinación es de tipo lineal, mediante un análisis de correlación (tabla # 7), es decir que siguen un comportamiento muy semejante durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*.

Por lo tanto, en esta hipótesis se quería identificar: Si la actividad hemoaglutinante o mitogénica estaban relacionadas con las etapas de desarrollo de las leguminosas, entonces podrían identificarse los cambios en la actividad hemoaglutinante de la fitohemoaglutinina obtenida durante las diversas etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris*. Y de acuerdo a los resultados obtenidos, sí se identifican los cambios en la actividad hemoaglutinante que si bien no llegan a recuperar los valores iniciales, a partir del 78 día se observa tendencia a aumentar y posiblemente como no se obtiene la semilla completamente madura y seca no llega a recuperar los valores iniciales.

Es muy interesante como durante el proceso de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* se observan cambios que podrían explicar la regulación génica para el crecimiento de la planta.

Esto también depende de las condiciones de crecimiento, cosecha y almacenamiento, sería conveniente realizar más estudios al respecto, donde se lleve un control muy estricto de las condiciones de crecimiento, cosecha y almacenamiento de la planta, se puedan realizar más repeticiones de obtención de los extractos, como mayores repeticiones en cuantificaciones que permita realizar un análisis estadístico más completo.

Aunque este trabajo espera haber contribuido al desarrollo del tema y desea despertar el interés para seguir estudiando la actividad Fitohemoaglutinante de *Phaseolus vulgaris*.

CONCLUSIONES

- La Fitoheмоaglutinina (PHA) obtenida del frijol negro común (*Phaseolus vulgaris*) tiene características de tener actividad Hemoaglutinante y Mitogénica; se obtiene más del 2 % del peso seco de la semilla.
- Los cambios observados durante el desarrollo de *Phaseolus vulgaris* podrían explicar la regulación génica que realiza la planta
- Para utilizar esta Fitoheмоaglutinina en el Laboratorio para las técnicas de Citogenética es mejor obtener el extracto durante el primer periodo en proceso de germinación o en los últimos días de crecimiento de la planta.
- Para obtener el extracto para realizar cuantificación Mitogénica se puede obtener de cualquiera de las etapas de desarrollo de *Phaseolus vulgaris* ya que en los puntos de estos periodos cuantificados no se aprecian cambios muy considerable, pero puede tenerlos.
- Al ser utilizado en el Laboratorio de Citogenética, observamos que produce metafases que permiten hacer un estudio aceptablemente; y podría ser de una calidad semejante a un producto comercial. Incluso puede proponerse un futuro proyecto que incluya la elaboración del producto para ofrecerlo a hospitales y laboratorios clínicos. Para ello sin duda se tendrá que realizar más estudios.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ABDULLAEV, F. I. y González, de Mejía E. (1996) "Inhibition of colony formation of HeLa cells by naturally occurring and synthetic agents". *BioFactors* 5(3): 133 - 38.
- 2) ALLAN, D. and Crumpton, M. J. (1971) "Fractionation of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris* by polyacrylamide gel electrophoresis in Sodium Dodecyl sulphate". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44(5): 1143 - 48.
- 3) ALLEN, L. W.; Svenson R. H. and Yachnin S. (1969) "Purification of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: Isolation of potent and weak phytohemagglutinins possessing mitogenic activity". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 63: 334 - 41.
- 4) BARDOCZ, S.; Grant, G.; Pusztai, A.; Franklin, M. F.; Carvalho, AFFU de, and De Carvalho, AFFU. (1996) "The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat". *Brit. J. Nutrition* 76(4): 613 - 26.
- 5) BARONDES, S. H. (1981) "Lectins: their multiple endogenous cellular functions". *Ann. Rev. Biochem.* 50: 207 - 31.
- 6) BHAGAVAN, N. V.
Bioquímica
Cap. 2.- Aminoácidos y proteínas, p. 52 - 57
México, 1984. Ed. Interamericana.
- 7) BHALLA, V.; Gaur, V. and Bhathia, K. (1978) "Lectin Studies: III. A survey of phytohemagglutinins; Interaction of lectins with erythrocytes of ten vertebrate species". *Vox Sang.* 35: 241 - 47.
- 8) BONORDEN, W. R. and Swanson, B. G. (1992) "Isolation and partial characterization of porcine Throglobulin-binding *Phaseolus vulgaris* L. lectin". *Food-Chem.* 44(3): 227 - 33.
- 9) BORREBAECK, C. A. K. (1984) "Detection and characterization of a lectin from non-seed tissue of *Phaseolus vulgaris*". *Planta* 161: 223 - 28.
- 10) BRELLES, M. G.; Costa, G. A. and Boiardi, J. L. (1996) "Enhancement of infection thread formation by *Rhizobium etli* inoculated with bean seed lectin". *Microbiol. Res.* 151(3): 243 - 46.
- 11) BUROW, M. D., Ludden, P. W. and Bliss, F. A. (1993) "Suppression of phaseolin and lectin in seed of common bean, *Phaseolus vulgaris* L.: Increased accumulation of 54 KDa polypeptides is not associated with higher seed methionine concentrations". *Mol. Gen. Genet.* 241(3-4): 431 - 439.
- 12) BURRIEL, M.; Fernando y Conde L.
Química Analítica Cualitativa
Cap. 5.- Proceso analítico de cationes, p. 239 - 50.
Madrid, 1972. Ed. Paraninfo Magallanes.
- 13) CARRETO M., L. (1989) "Purificación y caracterización de la Fitohemaglutinina aislada de *Phaseolus vulgaris*: Comportamiento con algunos cationes divalentes". Tesis de Licenciatura Q. F. B.; U N A M, FES-C.

- 14) CHERN, MS.; Eiben H. G.; Bustos, M. J. and Chern M. S. (1996) "The developmentally regulated bZIP factor ROM1 modulates transcription from lectin and storage protein genes in bean embryos". *J. Plant* 10(1): 135 - 48.
- 15) CHILSON, O. P. and Kelly Ch. A. E. (1989) "Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes". *Eur. J. Immunol.* 19: 389 - 96.
- 16) COOPER, E. H.; Barkhan P. and Hale, A. J. (1961) "Mitogenic activity of phytohemagglutinin". *LANCET* ii (july 22): 210.
- 17) CORDOVA, O. L. (1986) "Contribución al estudio de la actividad mitogénica de la fitohemaglutinina aislada de algunas variedades de *Phaseolus vulgaris* más comunes en México" Tesis de Licenciatura Q. F. B.; UNAM FES-C.
- 18) DAVIDSOHN, L.; Todd Sanford y Bernard H. J.
Diagnóstico y tratamiento clínico por el Laboratorio
Cap. 2.- Proteínas específicas, p. 221-30; Cap. 26.- Citogenética, p. 1841 - 46.
México, 1987; 7a. ed. reimpresión. Ed. Salvat.
- 19) DUPUIS, Gilles and Leclair B. (1982) "Studies on *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin: Structural requirements for simple sugar to inhibit the agglutination of human group A erythrocytes". *FEBS Lett.* 144(1): 29 - 32.
- 20) DUPUIS, G.; Martel, J.; Bastin, B.; Dion, J. and Payet, M. D. (1993) "Microtubules are not an essential component of phytohemagglutinin-dependent signal transduction in Jurkat T lymphocytes" *Cell. Immunol.* 146(1): 38 - 51.
- 21) FELSTED R. L.; Leavitt, R. D. and Bachur, N. R. (1975) "Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography" *Biochem. Biophys. Acta* 405(1075): 72-81
- 22) FELSTED, R. L.; Leavitt R. D. and Bachur, N. R. (1976) "Precipitation reactions of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) phytohemagglutinin isolectins". *Comp. Biochem. Physiol.* 55 B: 417 - 21.
- 23) FELSTED, R. L.; Leavitt, R. D.; Chen, Ch.; Bachur, N. R. and Dale, R. M. K. (1981) "Phytohemagglutinin isolectin subunit composition" *Biochem. Biophys. Acta* 668: 132 - 40.
- 24) FORRIERS, A.; Wuilmart, C.; Sharon, N. and Strosberg, A. D. (1977) "Extensive sequence homologies among lectins from leguminous plants" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 75(4): 980 - 86.
- 25) GRANT, G.; Henderson, L. T.; Edwards, J. E.; Ewan, E. C.; Bardocz, S. and Puszatai, A. (1997) "Kidney bean and soybean lectins cause enzyme secretion by pancreatic acini *in vitro*" *Life Sciences* 60(18): 1589 - 95.
- 26) GREEN, E. D. and Baensinger, J. U. (1987) "Oligosaccharide specificities of *Phaseolus vulgaris*; Leukoagglutinating and erythroagglutinating phytohemagglutinins". *J. Biol. Chem.* 262(25): 12018 - 29.
- 27) GUZMAN, M. S. H.; Marin, J.; Castellanos J. Z.; González de Mejía, E. and Acosta, G. J. A. (1996) "Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus*(Boh) (Coleoptera, bruchidae) and *Acanthoceludes obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)". *J. Stor. Prod. Res.* 32(1): 53 - 58.

- 28) HABER, A. y Runyon, R.
Estadística
Cap. 16.- Introducción al Análisis de Varianza, p. 246 - 58
México, 1984. Ed. Fondo Educativo Interamericano.
- 29) HAELRYCK, T. W.; Minh, H. D. T.; Poortmans, F.; Crispeels, M. J.; Wyns, L. and Loris, R. (1996)
"The crystallographic structure of phytohaemagglutinin-L." J. Biol. Chem. 271(34): 20479 - 85.
- 30) HARTWECK, L. M. and Osborn T. C. (1997) "Altering protein composition by genetically removing phaseolin from common bean seeds containing arcelin or phytohemagglutinin". Theor. Appl. Gen. 95(5-6): 1012 - 17.
- 31) HIRSCHHORN, R. Brittinger, G.; Hirschhorn, K. and Weissmann, G. (1968) "Studies on lysosomes: XII. Redistribution of acid hydrolases in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin" J. Cell Biol. 37: 412- 23.
- 32) JAFFE, W. G.; Levy A. and González D. I. (1974) "Isolation and partial characterization of bean phytohemagglutinins". Phytochemistry 13: 2685 - 93.
- 33) J: Bowles, D. (1983) "El enigma de las Lectinas". Mundo Científico 22 (17): 886
- 34) KAMEMURA, K.; Ozeki, M., Furuichi, Y.; Umekawa, H. and Takahashi, T. (1996) "Characterization of a lectin from the leaves of Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L." Biosci. Biotech. Biochem. 60(4): 608 - 11.
- 35) KOLODNY, R. L. and Hirschhorn K. (1964) "Hematology: Properties of phytohaemagglutinin". NATURE 201(4920): 715 - 16.
- 36) LEAVITT, R. D.; Felsted R. L. and Bachur N. R. (1977) "Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins". J. Biol. Chem. 252(9): 2961- 66.
- 37) LIS, H. and Sharon N. (1973) "The Biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins)". Ann. Rev. Biochem. 42: 541 - 74.
- 38) LIS, H. and Sharon, N. (1986) "Lectins as molecules and as tools". Ann. Rev. Biochem. 55: 35 - 67.
- 39) LOPEZ, B. B. y Chávez, G. M. E.
Manual de uso del paquete estadístico NWA Estapak "Un enfoque a la Biomedicina".
México 1994. U.N.A.M.; F.E.S.-C.
- 40) LOPEZ, M. C. A. y Quintero, R. R.
Tecnología Enzimática, Aplicada en Alimentos y Medicamentos
Purificación de Enzimas, p. 61-78.
México 1987. U.N.A.M.
- 41) MAHLER, R. H. y Cordes H. E.
Química Biológica
Cap. 2.- Proteínas: Clasificación, propiedades, Purificación, p. 67 - 69.
México, 1971. Ed. Omega.
- 42) MALDONADO, G.; Porras, F.; Fernández, L.; Vázquez, L. and Zenteno, E. (1994) "Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity". Immunol. Inv. 23(6-7): 429 - 36.

59
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 43) MARGNY, R. A.
 Inmunología e Inmunquímica
 Cap. III.- Métodos de uso corriente en Inmunquímica, p. 464, 619 - 61.
 4a. ed. México, 1990. Ed. Medica Panamericana.
- 44) MARINO, G. B. and Boiardi, J. L. (1992) "Role of bean lectins in *Rhizobium phaseoli- Phaseolus vulgaris* interactions: Some properties of lectins from two bean cultivars". World J. Microb. Biotech. 8(6): 573 - 78.
- 45) MARTIN, C. M. A.; Esteban, R. M.; Waldron, K. W.; Maina, G.; Grant, G. and Bardocz, S. (1995) "Hard to cook phenomenon in beans: changes in antinutrient factors and nitrogenous compounds during storage". J. Sci. Food Agric. 69(4): 429 - 35.
- 46) MATSUBARA, K.; Tanabe, K.; Akane, A.; Nakamura, H.; Takahashi, S. and Kimura, K. (1994) "As novel assay for typing Rh antigens in blood-stains using a lectin specific to the bisecting N-acetyl-D-glucosamine side chain of glycoprotein". J. Immunol. Methods. 173(2): 175 - 80.
- 47) MILLER, J. B. and Noyes C.; Heinrichson, R.; Kingdo, H. S. and Yachnin, S. (1973) "Phytohemagglutinin mitogenic proteins: Structural evidence for a family of isomitogenic proteins". J. Exp. Med. 138: 939 - 51.
- 48) MILLER, J. B. and Hsu R. (1975) "Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1388 - 91.
- 49) MORSE, J. H. (1968) "Immunological studies of phytohaemagglutinin: I.- Reaction between phytohaemagglutinin and normal sera". Immunology 14: 713 - 24.
- 50) MUELENAREA, H. J. H. (1965) "Toxicity and hemagglutinin activity of legumes". NATURE 206(4986): 827 - 28.
- 51) OH, Y. H. and Conard, R. A. (1971) "Some properties of mitogenic components isolated from phytohemagglutinin by a preparative gel electrophoresis". Arch. Biochem. Biophys. 146: 525 - 30.
- 52) PECKSOK, L. y Shields D.
 Métodos Modernos de Análisis Químicos
 Cap. 6.- Cromatografía en columna de líquidos, p. 103 - 13.
 México, 1983. Ed. Limusa.
- 53) PRYME, I. F.; Pusztai, A. J.; Grant, G. and Bardocz, S. (1996) "Dietary phytohaemagglutinin slows down the proliferation of a mouse plasmacytoma (MPC-11) tumor in Balb/c mice". CANCER Lett. 103(2): 151 - 55.
- 54) PUEYO, J. J. and Delgado-Salinas, A. (1997) "Presence of alpha-amylase inhibitor in some members of the subtribe *Phaseolinae* (*Phaseoleae*, *Fabaceae*)". Am. J. Botany 84(1): 79 - 84.
- 55) RAYON, C.; Gomord, V.; Faye, L. and Lerouge, P. (1996) "N-glycosylation of phytohemagglutinin expressed in bean cotyledons or in transgenic tobacco cells". Plant Phys. Biochem. Paris 34(2): 273 - 81.
- 56) REISNER, Y.; Lis, H. and Sharon, N. (1976) "On the importance of the binding of lectins to cell surface receptors at low lectin concentrations". Exp. Cell. Res. 97: 445 - 48.
- 57) RIGAS, D. A. and Osgood, E. E. (1955) "Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*". J. Biol. Chem. 212: 607 - 15.

- 58) SHARON, N. and Lis, H. (1972) "Lectins: Cell-agglutinating and sugar - specific proteins" *SCIENCE* 177(4053): 949 - 59.
- 59) SINGER, S. J. and Nicholson, G. L. (1972) "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes". *SCIENCE* 175: 720 - 31.
- 60) TAKAHASHI, T.; Ramachandramurthy, P. and Liener, I. E. (1967) "Some physical and chemical properties of a phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*". *Biochem. Biophys. Acta* 133: 123 - 33.
- 61) TOYOSHIMA, S.; Fukuda, M. and Osawa, T. (1972) "Chemical nature of the receptor site for various phytomitogens". *Biochemistry* 11(21): 4000 - 05.
- 62) VENTER, F. S. and Thiel, P.G. (1995) "Red kidney beans -- to eat or not to eat?" *Afr. Med. TYDSKR* 85(4): 250 - 52.
- 63) WEBER, K. and Osborn, M. (1969) "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis". *J. Biol. Chem.* 244(16): 4406 - 12.
- 64) WEBER, T. H.; Aro H. and Nordman, C. T. (1972) "Characterization of lymphocyte -stimulating blood cell - agglutinating glycoproteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*)". *Biochem. Biophys. Acta* 263: 94 - 105.
- 65) YACHNIN, S.; Allen, L. W.; Baron, J. M. And Svenson, R. H. (1972) "The potentiation of phytohemagglutinin induced lymphocyte transformation by cell - cell interaction: A matrix hypothesis". *Cell. Immunol.* 3: 569 - 89.
- 66) YACHNIN, S. and Svenson, R. H. (1972) "The immunological an physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*". *Immunology* 22: 871 - 83.
- 67) ZENTENO, E.; Parra, C.; Rayón, I y Montañó, L. F. (1994) "Las lectinas una herramienta de la biología molecular". *Rev. Bioquímica*, p.132 - 37.
- 68) ZOMBORSZKY, Z.; Horn, E.; Tuboly, S. and Gyodi, P. (1997) "Some haematological and immunological parameters of farmed deer in Hungary". *Acta Vet. Hungr.* 45(1): 75 - 84.