

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

Detección, purificación y posibles roles biológicos de diferentes galectinas porcinas

Lic. María Elena Chiesa

Directora:

Dra. Nilda E. Fink

*Trabajo
Nº 1056*

Trabajo de tesis presentado para optar al grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas

Lugar de trabajo

Asignatura Hematología, Area Bioquímica Clínica, Departamento de
Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional
de La Plata.

DONACION.....

La Plata, 2004

Fecha.. 16-09-04 ..

inv. R..... inv..... B. 57162

4033

Dedicatoria

*A Luis, recordando todos los
momentos compartidos*

*A mis queridos hijos
Pilar Consuelo, María y Luis*



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

DONACION.....
A.....
Fecha *16-09-04*
Inv. #..... Inv..... *57162*

Agradecimientos

- A la Dra. Nilda Ester Fink por la guía permanente durante los años que trabajamos en este proyecto y su estímulo para que se concretara este trabajo de tesis.
- A mis compañeros de la Cátedra de Hematología de la Facultad de Ciencias Exactas por colaborar permanentemente con su amistad y su tiempo.
- A la Dra. María Teresa Elola porque contribuyó a mi formación teórica y experimental en el tema de galectinas.
- A la Dra. Carlota Wolfenstein de Todel y la Dra. María Mercedes Iglesias, del Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB, UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, por su contribución en la realización de algunos pasos experimentales de esta Tesis.
- A los miembros del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), en especial a la Dra. Cristina Añón por permitir el uso de equipamiento, así como a la Srta. Paula Afalo y a la Dra. Jessica Minnard por su contribución en la realización de algunas determinaciones.
- A los miembros del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), en especial al Dr. Lagares por permitir el uso del equipamiento necesario para la liofilización de muestras.
- A la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por facilitarnos el uso de equipamientos.
- Al Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Superiora Sor María Ludovica, en especial al Bioq. Luis Pistaccio por su contribución en la realización de algunas determinaciones de este trabajo de Tesis.
- Al Sr. Egea que nos facilitó la obtención de sangre de cerdo.

- Al frigorífico La Pompeya de Marcos Paz por proporcionarnos los bazos y sangre de cerdo que utilizamos para la realización de este trabajo.
- Al Dr. Michel Caron del Laboratoire Biochimie des Proteins et Proteomique, Universite Paris Nord, Francia por la donación de anticuerpos que usamos en esta Tesis.
- Al Dr. Hans J. Gabius del Institut für Physiologische Chemie, Ludwig-Maximilians-Universität, Alemania, por la donación de la aglutinina de *Viscum Album* que utilizamos en esta tesis.
- A la Srta. Ana María Martínez por su eficiencia en la preparación de este manuscrito.
- A todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de esta Tesis.

Resumen

Las *galectinas* son lectinas animales que poseen afinidad por azúcares β -galactosídicos y comparten secuencias consenso en el dominio que une carbohidratos. Se han identificado 14 galectinas. La identidad entre dominios que ligan carbohidratos de distintas galectinas de una especie de mamífero oscila entre 20-40 % mientras que la identidad de un mismo tipo de galectina, por ejemplo la galectina-1, entre distintas especies de mamífero es de 80-90%. Las lectinas animales han sido motivo de estudio en las últimas décadas porque actuarían mediando en el reconocimiento celular en diversos sistemas biológicos, dada su conservación evolutiva y la amplia distribución tisular dentro de cada especie. Las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos) protegen a los organismos superiores contra las infecciones. Hay evidencias de que las galectinas están involucradas en la activación de las células inflamatorias, por lo tanto es importante estudiar como modulan la respuesta de dichas células.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron los siguientes:

- 1) Se aisló y purificó una galectina a partir de bazo porcino por extracción con lactosa y posterior cromatografía de afinidad. Esta galectina fue caracterizada por SDS -PAGE como un homodímero con subunidades de peso molecular 14 kDa. En los ensayos de hemoaglutinación se observó que los inhibidores más potentes fueron los azúcares con configuración de β -galactósidos (tiodigaactósido, lactulosa, N-acetilgalactosamina, p-nitrofenillactosa y lactosa): esto es semejante a lo que ocurre con otras galectinas-1. Por secuenciación se demostró que tiene un dominio de reconocimiento de carbohidrato del tipo I (prototipo), comparado con otras galectinas de vertebrados. Se observó también una reacción antigénica cruzada entre galectina-1 de bazo porcino y galectina-1 de bazo humano frente a anticuerpos policlonales de conejo antiglectina-1 de bazo porcino y humano y con policlonales y monoclonales contra galectina-1 de cerebro humano. Así la molécula pudo ser clasificada como galectina-1.
- 2) Se aisló y purificó una galectina a partir de un gran número de neutrófilos porcinos por extracción con lactosa y posterior cromatografía de afinidad. Por SDS-PAGE de la muestra purificada se observó la presencia de una banda 14 kDa y otra 30 kDa que podrían representar las subunidades de galectina-1 y el dímero no dissociado. En el *immunoblotting* con anticuerpo policlonal de conejo antiglectina-1 de bazo porcino, se observó una banda a 14 kDa. Por FPLC del eluato de la cromatografía de afinidad, se obtuvo un solo pico, lo cual descartó que en las condiciones experimentales empleadas estuviéramos ante la presencia de otro miembro de la familia de las galectinas. La secuenciación parcial permite decir que el DRC corresponde a una galectina de tipo I. Así la molécula pudo ser clasificada como galectina-1.
- 3) La estimulación de NADPH-oxidasa en neutrófilos porcinos con galectina-1 esplénica porcina aumentó la producción de superóxidos en forma dosis dependiente en el rango 2,5-10 μ M. A la concentración de 1 μ M la galectina-1 esplénica porcina fue un estimulador débil mientras que a 10 μ M en presencia

de citochalasina B la activación fue significativa y fue parcialmente bloqueada por lactosa 100mM (77%). La galectina-1 esplénica porcina es capaz de aumentar la producción de superóxidos frente a otros estímulos en dosis bajas (1 μ M) (fenómeno conocido como *priming*). La actividad de la enzima se inhibió totalmente por calentamiento a 46°C durante 10 minutos estimulando con PMA; se recuperó parcialmente con galectina-1 a los 10 minutos una actividad residual (14%) probablemente por la presencia de NADPH-oxidasa en la membrana.

- 4) La estimulación de la degranulación en neutrófilos porcinos con galectina-1 esplénica porcina entre 0-10 μ M produjo una buena respuesta medida como la liberación de lisozima aunque no tiene una relación lineal. La liberación de lisozima pudo ser parcialmente inhibida con lactosa 100 mM. La preestimulación de los neutrófilos porcinos con galectina-1 esplénica homóloga produjeron en general un aumento de la liberación de lisozima aunque no significativo.
- 5) La galectina-1 de bazo porcino produjo en los neutrófilos homólogos una disminución no significativa de la actividad fagocítica y la reducción significativa de la lisis. La preincubación de galectina-1 de bazo porcino con lactosa 100 mM produjo la reducción no significativa del número de candidas fagocitadas y lisadas.
- 6) La galectina-1 de bazo porcino exógena produjo la agregación de los neutrófilos humanos. Dicha agregación parece guardar una relación dosis-respuesta lineal significativa. Esto indica la presencia de ligandos/receptores para la galectina-1 en la superficie de los neutrófilos. También en los estudios por citometría de flujo se observó un aumento de fluorescencia con respecto a los controles (PBS y suero preimmune) cuando se incubaron los neutrófilos humanos en reposo con diferentes concentraciones de galectina-1 esplénica porcina (0-20 μ M), indicando que la galectina-1 se une a la superficie del PMN humanos. Además se observó el aumento de fluorescencia en los PMN incubados con anticuerpo antigalectina-1 y anticuerpo anticonejo-FITC, lo que estaría indicando la presencia de galectina endógena. Asimismo se observó un aumento significativo de fluorescencia en los PMN humanos preincubados con PMA y fMLP con respecto al control con PBS, frente a galectina-1 (0-2,5 μ M), lo que estaría indicando la exposición de ligandos presentes en los gránulos del PMN.
- 7) Por técnicas de inmunohistoquímica con PMN porcinos preincubados con galectina-1 de bazo porcino y anticuerpo policlonal antigalectina-1 de bazo porcino (segundo anticuerpo anticonejo-FITC) se observó la presencia de fluorescencia en la membrana. En algunas células se presentó una fluorescencia intensa en algunas regiones de las mismas. No se observó fluorescencia en los controles con PBS y suero de conejo preimmune. También se observó fluorescencia cuando se incubaron las improntas con antigalectina-1 de bazo porcino y anticonejo-FITC, lo que estaría indicando la presencia de galectina endógena en la membrana.
- 8) Se extrajeron las proteínas de las membranas de PMN humanos. En SDS-PAGE se observan bandas de diversos PM. El *immunoblotting* con galectina-1 y antigalectina-1 de bazo porcino mostró varias bandas en la región de PM entre

180 y 200 kDa, lo cual indica que los posibles ligandos/receptores corresponderían a proteínas que caen dentro de ese rango de pesos moleculares.

Nuestra hipótesis es que la galectina-1 de bazo porcino puede ser un estimulador natural de la formación de superóxidos y la degranulación en PMN porcinos si las concentraciones de galectina-1 en condiciones fisiológicas alcanzan los niveles adecuados. Las galectinas porcinas podrían producir mejores respuestas *in vivo* en neutrófilos en combinación con otros estímulos.

Contenido

	<u>Página</u>
Agradecimientos	iii
Resumen	v
Indice de tablas y figuras	xii
Indice de abreviaturas	xiv
1. Introducción	1
1.1 Lectinas	2
1.1.1 Lectinas animales	2
1.1.2 Estructura primaria de galectinas	3
a. Galectina-1	4
b. Galectina-2	5
c. Galectina-3	6
d. Galectina-4	7
e. Galectina-5	8
f. Galectina-6	8
g. Galectina-7	8
h. Galectina-8	8
i. Galectina-9	9
j. Galectina-10	9
k. Galectina-11	10
l. Galectina-12	10
m. Galectina-13	11
n. Galectina-14	11
o. Otras galectinas de vertebrados	11
1.1.3. Estructura cristalográfica de las galectinas	12
1.1.4. Especificidad glicídica	14
1.1.5. Ligandos endógenos	18
1.1.6. Secreción por vía no clásica	22
1.1.7. Roles biológicos de las galectinas	23
1.2. El neutrófilo	26
1.2.1. Producción y distribución de compartimientos	26
1.2.2. Composición y metabolismo del neutrófilo maduro	29
1.2.3. Gránulos y vesículas secretoras de los neutrófilos	31
1.2.4. Morfología y recuentos de neutrófilos en porcino	35
1.2.5. Función del neutrófilo	36
a) Opsonización y fagocitosis	38
1.2.6. Mediadores humorales de la respuesta inflamatoria	39
1.2.7. Moléculas de adhesión	42
1.2.8. Migración de los neutrófilos al sitio de inflamación	42
1.2.9. Funciones de los gránulos y vesículas	44
1.2.10. Resolución de la inflamación	45
1.2.11. Interacciones ligando-receptor	47
a) Los receptores	47
b) Proteínas G	49
c) Metabolismo de fosfolípidos	50

d) Proteínquinasas	51
e) Fusión de membranas y degranulación	52
1.2.12. Actividad microbicida	53
a) Mecanismos no oxidativos	53
b) Metabolismo oxidativo	54
2. Hipótesis, objetivos y diseño experimental	59
2.1. Hipótesis	60
2.2. Objetivos	60
2.3. Diseño experimental	62
3. Material y métodos	63
3.1. Obtención de galectinas de bazo y neutrófilos porcinos	64
3.1.1. Animales y muestras utilizadas	64
3.1.2. Obtención de homogenatos de bazo	64
3.1.3. Aislamiento de neutrófilos	65
3.1.4. Purificación de la galectina de bazo	66
a) Cromatografía de intercambio aniónico	66
b) Cromatografía de afinidad	67
c) Determinación del contenido proteico por el método de Bradford	67
d) Almacenamiento de la galectina-1 purificada en columnas de DEAE	68
3.1.5. Purificación de la galectina obtenida de neutrófilos	69
3.2. Caracterización bioquímica parcial de la galectina de bazo porcino	70
3.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	70
3.2.2. Determinación de la actividad lectínica hemoaglutinante	71
a) Preparación de suspensiones globulares desializadas	71
b) Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante	72
3.2.3. Inhibición de la actividad lectínica hemoaglutinante por azúcares específicos con glóbulos rojos de conejo desializados	73
3.2.4. Obtención de anticuerpos policlonales antigalectina esplénica porcina	74
3.2.5. Cromatografía de exclusión molecular	75
3.2.6. Digestión enzimática	76
3.2.7. Purificación de los péptidos por HPLC	76
3.2.8. Análisis de aminoácidos	76
3.2.9. Secuenciación de péptidos	77
3.3. Caracterización parcial de la galectina de neutrófilos porcinos	77
3.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	77
3.3.2. <i>Immunoblotting</i>	79
3.3.3. Cromatografía de exclusión molecular	79
3.3.4. Digestión enzimática	79
3.3.5. Purificación de los péptidos por HPLC	80
3.3.6. Análisis de aminoácidos	80
3.3.7. Secuenciación de péptidos	80
3.4. Efecto de la galectina esplénica porcina sobre neutrófilos homólogos	80
3.4.1. Obtención de polimorfonucleares (PMN) porcinos	81
3.4.2. Medición de la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa	81
a) Cálculo de la producción de nmoles de anión superóxido	83
b) Efectos combinados de diferentes estimuladotes	85
c) Inhibición de la actividad de NADPH-oxidasa	86

3.4.3. Medición de la liberación de lisozima	86
a) Degranulación	87
b) Medición de la lisozima	87
c) Efectos combinados de diferentes estimuladotes	89
3.4.4. Actividad fagocítico-lítica de polimorfonucleares	90
a) Preparación de los PMN	90
b) Preparación de la suspensión de candidas	90
c) Ensayo de fagocitosis y lisis	91
3.5. Unión de galectina-1 exógena de bazo porcino a neutrófilos y detección de galectina-1 endógena	92
3.5.1. Unión a neutrófilos humanos	92
a) Estudios de agregación	92
b) Estudios por citometría de flujo en neutrófilos humanos en reposo y activados	93
3.5.2. Unión a neutrófilos porcinos	95
a) Inmunohistoquímica	95
3.6. Estudios preliminares de ligandos/receptores para galectina-1 de membranas de PMN humanos	98
4. Resultados	100
4.1. Obtención de galectina de bazo porcino	101
4.2. Caracterización bioquímica parcial de la galectina de bazo porcino	102
4.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	102
4.2.2. Determinación de la actividad lectínica hemoaglutinante	102
4.2.3. Identificación de la proteína por <i>immunoblotting</i>	105
4.2.4. Purificación de los péptidos por HPLC	105
a) Secuenciación de péptidos	107
4.3. Caracterización bioquímica parcial de la galectina de neutrófilos porcinos	108
4.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	108
4.3.2. Cromatografía de exclusión molecular	108
a) Purificación de los péptidos por HPLC	110
b) Secuenciación de péptidos	110
4.4. Efectos de la galectina esplénica porcina sobre neutrófilos homólogos	111
4.4.1. Estudios hematimétricos	111
4.4.2. Medición de la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa	112
a) Estudios previos sobre el efecto de citochalasin B, fMLP y PMA	112
b) Efecto de galectina-1 esplénica porcina	114
c) Efectos combinados de diferentes estimuladotes	115
d) Efecto de la temperatura sobre la actividad de la NADPH-oxidasa	116
4.4.3. Medición de la liberación de lisozima	118
a) Estudios previos sobre el efecto de citochalasin B, fMLP y PMA	118
b) Efecto de galectina-1 esplénica porcina	120
c) Efecto combinado de diferentes estimuladores	121
4.4.4. Fagocitosis y lisis de <i>Candida pseudotropicalis</i> por PMN porcinos	122
4.5. Unión de galectina-1 exógena de bazo porcino y detección de galectina-1 endógena de PMN	124
4.5.1. Unión a neutrófilos humanos	125
a) Estudios de agregación	125
b) Estudios por citometría de flujo en neutrófilos humanos en reposo y activados	126

4.5.2. Unión a neutrófilos porcinos	130
a) Localización inmunohistoquímica de galectina-1 y ligandos/receptores de galectina-1	130
4.6. Estudios preliminares de ligandos/receptores para galectina-1 en membranas de PMN humanos	132
5. Discusión	134
5.1. Purificación y caracterización bioquímica parcial de galectinas de bazo y neutrófilos porcinos	135
5.2. Efecto de la galectina esplénica porcina sobre neutrófilos homólogos	138
5.2.1. Producción de superóxidos	138
5.2.2. Liberación de lisozima (degranulación)	145
5.2.3. Fagocitosis	148
5.3. Unión de galectina-1 exógena de bazo porcino a neutrófilos y detección de galectina-1 endógena	152
5.4. Estudios preliminares de ligandos/receptores para galectina-1 en membranas de PMN humanos	155
6. Conclusiones	158
7. Bibliografía	161

Índice de tablas y figuras

	<u>Página</u>
Figura 1. Interacción de la galectina-1 de bazo bovino con N-acetil-lactosamina	13
Figura 2. Conformación preferida de algunos azúcares β -galactosídicos	16
Figura 3. Diagrama de estadios de maduración de PMN	28
Figura 4. Producción de mediadores de ácido araquidónico	31
Figura 5. Fagocitosis	37
Figura 6. Interacciones del PMN con el endotelio	43
Figura 7. Degranulación: modelo de respuesta del PMN frente a un estímulo	52
Figura 8. Modelo hipotético de activación de la NADPH-oxidasa en PMN	55
Figura 9. Modelo de flujo de electrones en la NADPH-oxidasa	57
Figura 10. Fraccionamiento celular de sangre entera por centrifugación en F-H	65
Figura 11. Protocolo de estimulación de PMN con galectina-1	85
Figura 12. SDS-PAGE de la galectina de bazo porcino e condiciones desnaturalizantes	102
Figura 13. <i>Immunoblotting</i> de la galectina-1 de bazo porcino purificada	105
Figura 14. Perfil de elución de HPLC de los péptidos obtenidos por digestión triptica de galectina-1 esplénica	106
Figura 15. Comparación de secuencias de aminoácidos de diferentes galectinas-1	107
Figura 16. Electroforesis en SDS-PAGE 12% de galectina de PMN. tinción argéntica	109
Figura 17. <i>Immunoblotting</i> de galectina-1 de PMN porcinos	109
Figura 18. Cromatografía de exclusión molecular del material de PMN obtenido por afinidad en una columna de Superosa 12 HR 10/30, adaptada a un sistema de FPLC	110
Figura 19. Comparación de secuencias de aminoácidos de galectinas-1 de bazo y PMN porcinos	111
Figura 20. PMN aislados y con Cp fagocitadas y lisadas en el citoplasma	124
Figura 21. Agregación de PMN humanos con galectina-1 de bazo porcino	125
Figura 22. Fotografía de agregados de PMN humanos postincubación con galectina-1 de bazo porcino	126
Figura 23. Histogramas representativos de citometría de flujo	128
Figura 24. Efecto de la preincubación de PMN humanos con PMA (10 ng/ml) sobre la unión de galectina-1 de bazo porcino	129
Figura 25. Efecto de la preincubación de PMN humanos con fMLP	129
Figura 26. Localización inmunohistoquímica de galectina-1 endógena y ligandos de galectina-1 en PMN porcinos incubados en diferentes condiciones	131
Figura 27. SDS-PAGE 12% en condiciones desnaturalizantes del extracto de proteínas de membranas teñidas con Coomassie e <i>immunoblotting</i> de los geles de SDS-PAGE transferidos a nitrocelulosa e incubados en diferentes condiciones	132
Tabla 1. Modelo cristalográfico de galectina-1	14
Tabla 2. Contenido de los gránulos y vesículas secretoras de PMN humanos	33
Tabla 3. Factores quimiotácticos de granulocitos y monolitos en el hombre	40

Tabla 4. Protocolo para la determinación del contenido proteico	68
Tabla 5. Protocolo para la medición de superóxidos	83
Tabla 6. Protocolo para la medición de la liberación de lisozima	89
Tabla 7. Protocolo para estudios de agregación de PMN	92
Tabla 8. Protocolo para la detección de galectina endógena y ligandos totales para galectina-1 de bazo porcino en PMN humanos	96
Tabla 9. Purificación de galectina de bazo porcino	101
Tabla 10. Inhibición de la hemoaglutinación de galectina-1 de bazo porcino, por diferentes azúcares	104
Tabla 11. Reactividades cruzadas entre galectinas-1 detectadas por técnicas de <i>immunoblotting</i>	106
Tabla 12. Producción de superóxido por PMN porcinos estimulados con distintas concentraciones de fMLP	113
Tabla 13. Producción de superóxido por PMN porcinos estimulados con distintas concentraciones de PMA	114
Tabla 14. Producción de superóxido por PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de galectina-1 de bazo porcino, con y sin inhibición con lactosa 100 mM	115
Tabla 15. Efecto del estímulo de PMA sobre la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa en PMN preincubados con galectina-1 de bazo porcino	116
Tabla 16. Efecto del calentamiento de PMN a 46°C sobre la producción de superóxidos	117
Tabla 17. Liberación de lisozima de PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de fMLP sin y con citochalasina B	118
Tabla 18. Liberación de lisozima de PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de PMA	120
Tabla 19. Liberación de lisozima de PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de galectina-1 de bazo porcino	121
Tabla 20. Efecto de la preestimulación de los PMN con galectina-1 esplénica porcina sobre la liberación de lisozima de PMN homólogos activados con PMA	122
Tabla 21. Efecto de galectina-1 sobre la actividad fagocítica-lítica de PMN porcinos	123
Tabla 22. Efecto de la inhibición de galectina-1 sobre la actividad fagocítica y lítica de PMN porcinos	123
Tabla 23. Unión de galectina-1 de bazo porcino a PMN humanos en reposo por citometría de flujo	127

Índice de abreviaturas

ACD: ácido cítrico-citrato-dextrosa
BSA: albúmina sérica bovina
cAMP: ácido adenosinmonofosfato cíclico
CB: citochalacina B
CGD: enfermedad granulomatosa crónica
CLC: cristal de Charcot-Leyden
DE: desvío estándar
DMSO: dimetilsulfóxido
DRC: dominio de reconocimiento de carbohidratos
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EEM: error estándar de la media
fMLP: N-formil metionil L-leucil L fenilalanina
FPLC: cromatografía rápida para proteínas
GRC: glóbulos rojos de conejo
GRCD: glóbulos rojos de conejo desializados
Hanks: solución salina balanceada de Hanks
HBSS: solución salina balanceada de Hanks
HPLC: cromatografía líquida de alta presión
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1
IL-8: interleuquina 8
LAMPS: proteínas de membrana asociadas a lisosomas
Lectina de tipo C: lectinas Ca^{++} -dependientes.
Lectina de tipo S: lectinas sulfidrilo-dependientes (o S-Lac, o galectinas).
LFA-1: leukocyte function-associated antigen-1
LGALS1-7: genes de galectinas 1-7.
LPS: lipopolisacárido
LTB4: leucotrieno B4
MAC-1: molécula de adhesión celular-1
MEPBS: buffer de fosfatos, pH 7,2, Na Cl 150mM
MPO: mieloperoxidasa
NADPH: dinucleótido monofosfato de nicotinamida-adenosina
PAF: factor activador de plaquetas
PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS: Buffer fosfato-solución isotónica de cloruro de sodio, ClNa 150 mM
PECAM-1: molécula de adhesión celular de plaquetas y endotelio tipo 1
pI: punto isoelectrico
PM: peso molecular
PMA: forbol 12-miristato 13-acetato
PMN: polimorfonucleares

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
SDS: dodecilsulfato de sodio
SOD: superóxido dismutasa
t.a.: temperatura ambiente
TBS: Buffer tris-solución isotónica de cloruro de sodio
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TFA: ácido trifluoroacético
TNF: factor de necrosis tumoral
Tris: tris(hidroximetil)-aminometano
TxB₂: tromboxano B₂
UH: Unidad hemoaglutinante

Las azúcares mencionados en este trabajo están en la configuración D, a menos que se indique la configuración L.

Las abreviaturas de aminoácidos utilizadas en este manuscrito corresponden a la nomenclatura internacional de una letra.

1. Introducción

1.1 Lectinas

Las lectinas son proteínas que se caracterizan por intervenir en interacciones proteína-carbohidrato y entre otras propiedades poseen la capacidad de aglutinar células y de precipitar glicoconjugados. Se han descrito lectinas de origen vegetal y animal. Las primeras lectinas identificadas fueron de origen vegetal y han sido usadas en el laboratorio para tipificación de grupos sanguíneos, como agentes mitogénicos en linfocitos, en estudios relacionados con metástasis, entre otros.

1.1.1. Lectinas animales

Las lectinas animales tienen una gran diversidad en cuanto a su estructura primaria; fueron clasificadas en cinco familias (Gabiús, 1997).

- a) La familia de lectinas de *tipo C* incluye miembros que poseen una actividad de unión a carbohidratos *dependiente de Ca^{++}* (la designación *C* hace referencia al Ca^{++}) y un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) homólogo al primeramente identificado en el receptor para asialoglicoproteínas (Drickamer, 1993; Hirabayashi, 1993; Vasta, 1992).
- b) La familia *tipo I* tiene un único motivo ancestral cuyo plegamiento es similar al de las inmunoglobulinas, por lo que se las denomina *DRC tipo I similar a inmunoglobulinas* (Williams y Barclay, 1988). Estas lectinas no requieren la presencia de cationes divalentes y poseen especificidad por distintos azúcares como manosa, heparina, ácido hialurónico o ácido siálico.
- c) Galectinas, previamente conocidas como lectinas de *tipo S* porque su actividad de unión a carbohidratos depende de reactivos *sulfidrilos* (la designación *S* hace referencia al *sulfidrilo*) (Barondes, 1984).

Las *galectinas* son lectinas animales que poseen afinidad por azúcares β -galactosídicos y comparten secuencias consenso en el dominio que une carbohidratos. Anteriormente, estas lectinas fueron llamadas lectinas de *tipo S* y *S-*

Lac, ya que todos los miembros del grupo son *solubles* y ligan *lactosa* y otros oligosacáridos β -galactosídicos (Elola y Fink, 2000a).

- d) Lectinas de *tipo P* (con DRC de *tipo P*) y las *pentraxinas*. El DRC de tipo P no se ha encontrado en otras proteínas y no está relacionado con los DRC de tipo C o S. Se demostró únicamente en los receptores para Man-6-fosfato que cumplen un rol en el tránsito intracelular de las enzimas lisosomales (Kornfeld, 1992). Existen receptores catión-dependientes que poseen sólo un DRC del tipo P, mientras que otros receptores catión-independientes presentan 15 copias de ese DRC. El receptor Man-6-fosfato independiente de cationes resultó ser el factor II de crecimiento similar a insulina, sugiriendo que algunos dominios son activos en el reconocimiento de otros ligandos (Kornfeld, 1992).

- e) Las *pentraxinas*, la proteína C-reactiva (PCR) y el componente sérico amiloide P (PAS), son proteínas séricas que comparten la propiedad de formar oligómeros basados en un pentámero cíclico de subunidades idénticas de peso molecular (PM) 20-30 kDa. Presentan alrededor de un 50% de homología de secuencia primaria entre ellas. Aunque estas secuencias aminoacídicas no están relacionadas al DRC de tipo C, estas proteínas muestran propiedades de interacción con los ligandos que dependen de Ca^{++} . La PCR es una proteína reactante de fase aguda y fue identificada como un receptor específico para Gal en macrófagos hepáticos. Interactúa con fosforilcolina y galactanos. Se demostró que la PCR puede actuar como opsonina y que los complejos PCR-ligando activarían la vía clásica del complemento e interactuarían con los neutrófilos para desencadenar la fagocitosis (Vasta y Pont-Lezica, 1990).

1.1.2 Estructura primaria de galectinas

Los miembros de esta familia de lectinas se definen por dos propiedades: secuencias de aminoácidos características compartidas y afinidad por azúcares β -galactosídicos.

Primeramente, cuatro galectinas de mamífero fueron secuenciadas y bien caracterizadas en diferentes especies, recibiendo la denominación de galectina-1 a galectina-4

(Barondes et al., 1994a; Barondes et al., 1994b). Posteriormente se agregaron las galectinas-5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13 y -14 (Yang y Liu 2003).

La identidad entre dominios que ligan carbohidratos de distintas galectinas de una especie de mamífero oscila entre 20-40% (Oda et al., 1993), mientras que la identidad de un mismo tipo de galectina, por ejemplo la galectina-1, entre distintas especies de mamíferos, es de 80-90% (Hirabayashi y Kasai, 1993).

A continuación, se describen las principales propiedades de las galectinas de mamíferos hasta ahora descriptas.

a) Galectina-1

La galectina-1 es un dímero con un PM de la subunidad de alrededor de 14,5 kDa codificada por el gen LGALS1 (las iniciales designan *lectina*, que une *galactosa soluble*) (Barondes et al., 1994a).

En humanos, esta galectina fue secuenciada, por ejemplo, a partir de placenta (Hirabayashi y Kasai, 1988; Couraud et al., 1989), en la línea celular de leucemia promielocítica HL-60 (Couraud et al., 1989), en pulmón (Gitt y Barondes, 1986; Hirabayashi et al., 1989) y en la línea celular de hepatoma HepG2 (Abbott y Feizi, 1989; Gitt y Barondes, 1991). En bovino, se dispone de la secuencia completa de las galectinas-1 de corazón y de la línea celular de fibroblastos EBTr (Abbot y Feizi, 1989) y de bazo (Liao et al., 1994). Otras galectinas-1 secuenciadas son las de pulmón, útero (Clerch et al., 1988) y cerebro de rata (Hynes et al., 1990), la de corazón de cerdo (Merkle et al., 1989).

El gen posee cuatro exones y tres intrones, siendo las zonas de uniones entre ambos coincidentes con secuencias consenso. No existen secuencias genómicas para el péptido señal secretorio. La secuencia del dominio que liga carbohidrato está principalmente codificada por tres exones y la mayoría de los residuos conservados están en el exón III (Gitt y Barondes, 1991), que serían responsables de la unión a los carbohidratos. La región *upstream* (extremo 5' del ADNc), o secuencia de arriba, posee una secuencia

similar a la de la caja TATA y secuencias consenso para diferentes elementos regulatorios como glucocorticoides, metales y elementos de shock térmico. La zona 3' del gen, pasado el codón de terminación TGA (secuencia *downstream*), posee una señal consenso de poliadenilación AATAAA y una secuencia de G/T alternantes más larga que la encontrada en la mayoría de las regiones 3' de eucariotas (Gitt y Barondes, 1991).

Hirabayashi y Kasai (1993) propusieron una clasificación de las lectinas β -galactosídicas. Según esta clasificación, las galectinas-1 pertenecen al tipo *proto*, porque presentan solamente un dominio lectínico o DRC. También se las denomina L-14 o galaptina.

La homología de galectinas-1 entre distintas especies de mamífero es de 80-90%, resultando sencillo identificar lectinas equivalentes en estas especies (Hirabayashi y Kasai, 1993).

El gen LGALS1 se detectó en el cromosoma humano 22, en la región q13 (Mehrabian et al., 1993) y en el cromosoma 15 de ratón (Poirier et al., 1992).

b) Galectina-2

La galectina-2, previamente conocida como L-14-II, es un homodímero con una subunidad de PM 14,65 kDa que fue originalmente detectada en la línea celular de hepatoma humano HepG2 (Gitt y Barondes, 1986; Gitt et al., 1992). También se ha encontrado y clonado a partir de células epiteliales de estómago de rata (Oka et al., 1999) y en intestino delgado porcino (Wintero et al., 1996). Según la clasificación de Hirabayashi y Kasai esta galectina pertenece al tipo *proto*, al igual que galectina-1, ya que ambas presentan solamente un dominio lectínico (Hirabayashi y Kasai, 1993).

Posee un 43% de identidad de secuencia primaria con la galectina-1 humana (Abbott y Feizi, 1989; Oka et al., 1999).

Tanto el gen LGALS1 como el LGALS2 no poseen una secuencia detectable para el péptido señal amino-terminal (Gitt et al., 1992), hallazgo común a toda la familia de galectinas.

LGALS2 se halló en el cromosoma humano 22, en la región q12-q13, muy próximo al gen LGALS1 (Mehrabian et al., 1993).

c) Galectina-3

La galectina-3 fue estudiada por distintos grupos de trabajo. Se aísla como un monómero de entre 26,2 a 30,3 kDa según las especies, aunque los PM aparentes en electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) resultan mayores (hasta 35 kDa) (Wang et al., 1992 ; Hughes, 1994).

Previamente esta lectina fue denominada CBP-35 (48), proteína que liga IgE (*IgE-binding protein*) o ϵ BP (Laing et al., 1989), L-29 (Leffler y Barondes, 1986; Oda et al., 1991), Mac-2 (Cherayil et al., 1989), proteínas asociadas a metástasis tanto en ratón (mL-34) (Raz et al., 1989) como en humano (hL-31) (Raz et al., 1989) y proteína no-integrina que liga laminina (Woo et al., 1990).

En humanos, se secuenció en macrófagos (Cherayil et al., 1990), en células Hela (Robertson et al., 1990; Hsu et al., 1992), en carcinoma de mama (Oda et al., 1991) y en fibrosarcoma HT-1080 (Raz et al., 1991). En intestino delgado porcino, también se secuenció una galectina-3 (Wintero et al., 1996). Esta galectina también ha sido descrita en neutrófilos y en eosinófilos.

Consiste de un dominio que liga carbohidratos en la posición carboxilo-terminal o dominio-C, homólogo a la galectina-1 (aminoácidos 119-262 en la rata, Herrmann et al., 1993), un dominio repetitivo o dominio-R -rico en Pro, Gly y Tyr (aminoácidos 21-118, en la rata) y un dominio amino-terminal corto o dominio-N (aminoácidos 1-20). Hirabayashi y Kasai clasificaron a esta galectina como perteneciente al *tipo quimera*, debido a la presencia de un dominio lectínico y otros no lectínicos en un mismo polipéptido (Hirabayashi y Kasai, 1993). El dominio -R y el N serían responsables de la

tendencia de la lectina a la multimerización: la autoagregación de las galectinas -3 de rata y ratón estaría mediada por el dominio -R o por ambos, ya que cuando éstos son clivados por colagenasa se pierde la actividad hemoaglutinante dependiente de la concentración de estas lectinas, que requiere multivalencia de sitios de unión de carbohidratos.

El gen que codifica la galectina-3 fue denominado: LGALS3 (Barondes et al., 1994a). La galectina-3 es monomérica y monovalente.

Si se comparan galectinas diferentes, por ejemplo en humanos, las galectinas-1 y -3 presentan 24% de identidad de secuencia primaria total.

d) Galectina-4

La galectina-4 es un monómero de PM 36 kDa encontrado en intestino de rata, que contiene dos dominios que ligan carbohidratos (I y II), homólogos pero diferentes, en la misma cadena polipeptídica. Estos dominios están conectados por una región (aminoácidos 151-177) homóloga al dominio repetitivo de la galectina-3 rico en Pro, Gly, Tyr y Phe (Oda et al., 1993). Otras galectinas-4 se han encontrado en el tracto alimentario incluyendo mucosa oral de porcino (Chiu et al., 1994), esófago (Wasano e Hirakawa, 1995) y en la línea celular T84 de adenocarcinoma humano de colon (Huflejt et al., 1997).

Según la clasificación de Hirabayashi y Kasai, esta galectina-4 pertenece al *tipo de repetición en tandem*, ya que posee dos dominios lectínicos contiguos en la secuencia peptídica, al igual que la galectina del nematode *Caenorhabditis elegans*. Estos dominios serían resultado de la duplicación génica (Hirabayashi y Kasai, 1993).

La galectina-4 es monomérica y divalente. Los dominios I y II presentan diferente especificidad de unión a carbohidratos y una identidad de secuencia aminoacídica de 36% entre ellos. El dominio I no posee ninguna Cys (Oda et al., 1993), al igual que dos galectinas de anguilas (Paroutaud et al., 1987; Muramoto y Kamiya, 1992).

e) Galectina-5

Posteriormente se secuenció la galectina-5, una proteína monomérica de 16,2 kDa presente en eritrocitos de rata (Gitt et al., 1995) (Gen: LGALS5). Originalmente fue llamada *RL-18* (*rat lung 18*), ya que aparentaba poseer un PM de 18 kDa (Cerra et al., 1985). Se encuentra en eritrocitos y en reticulocitos, habiéndose aislado el ARNm respectivo de éstos últimos. Estaría relacionada a la lectina llamada *aglutinina del desarrollo eritroide* (EDA) de eritrocitos, eritroblastos y médula ósea de conejo (Harrison y Chesterton, 1980b; Harrison y Wilson, 1992).

f) Galectina-6

Fue detectada y secuenciada en tracto gastrointestinal de ratón (Gitt et al., 1998). La molécula se presenta como un polipéptido de 36 kDa que posee dos dominios DRC en tandem, de 140-150 aminoácidos cada uno, con una homología entre ellos del 38,5-39%, pero carece del péptido *linker* de 24 aminoácidos presente en galectina-4.

g) Galectina-7

La galectina-7 humana se secuenció a partir de queratinocitos y resultó ser un monómero de 12,7 kDa, con un pI de 7,6 (Gen: LGALS7) (Madsen et al., 1995).

La secuencia del ADNc corresponde a una proteína de 136 aminoácidos, con un pI teórico de 7,1, y un PM de alrededor de 14 kDa, que posee los residuos conservados típicos de las galectinas.

h) Galectina-8

La galectina-8 fue clonada a partir de ADNc de hígado de rata, que codifica para 316 aminoácidos, o sea un monómero de aproximadamente 35 kDa. Contiene dos dominios homólogos que ligan carbohidratos de unos 140 aminoácidos en la misma cadena polipeptídica, unidos por una zona de 32 residuos y con un porcentaje de homología del 38% entre ellos (Hadari et al., 1995). Ambos dominios presentan los aminoácidos

conservados típicos de las galectinas. Por lo tanto, la galectina-8 es monomérica y divalente, al igual que la galectina-4.

El dominio N-terminal posee una sustitución de la Arg-73 (según la nomenclatura para galectina-1), indispensable para la interacción con los carbohidratos, por Ile, mientras que el dominio C-terminal presenta esa Arg. Esto podría determinar una especificidad glicídica diferente del dominio amino-terminal .

i) Galectina-9

La galectina-9 fue descubierta casi simultáneamente en riñón de embrión de ratón (Wada y Kanwar, 1997)) y en una biblioteca de cDNA de bazo humano de una paciente con la enfermedad de Hodgkin (Tureci et al., 1997). La molécula se presenta como un polipéptido de 36 kDa que posee dos dominios DRC en tandem de 140-150 aminoácidos cada uno, con una homología entre ellos del 38,5-39%, unidos por un péptido *linker* de 26 y 30 aminoácidos en ratón y humanos, respectivamente. El dominio N-terminal de la galectina-9 humana presenta homología moderada con otras galectinas, el dominio C-terminal tiene un 70% de homología de secuencia aminoacídica con galectina-5 de rata. Considerando los cambios de aminoácidos conservados, la homología de este dominio C de la galectina-9 humana con la galectina-5 de rata se eleva al 93%.

Cuando se obtuvo el cDNA de leucocitos humanos de sangre periférica, la secuencia de la galectina-9 resultó idéntica a la de bazo humano de paciente de Hodgkin.

j) Galectina-10

La proteína del cristal de Charcot-Leyden (CLC) de eosinófilos y basófilos humanos posee un 43-48% de homología de secuencia de aminoácidos con la familia de las galectinas y ha sido clasificada como la galectina-10 (Dyer et al., 1997). La estructura cristalina de CLC ya ha sido dilucidada y resultó idéntica topológicamente a aquella de galectina-1 y galectina-2 (Leonidas et al., 1995). El mayor grado de homología observado fue de 48% entre CLC y galectina-3, que se encuentra en el mismo rango que

las homologías calculadas entre galectina-1 y -7, o entre galectina-2 y -7. Esta galectina-10 posee actividad enzimática de lisofosfolipasa, aunque no presenta homología de secuencia de aminoácidos con otras lisofosfolipasas de mamíferos.

En cuanto a la especificidad glucídica, la galectina-10 presenta baja capacidad de *binding* a lactosa ($IC_{50}=40,8$ mM, concentración de azúcar requerida para obtener el 50% de la inhibición de la aglutinación de glóbulos rojos), lo cual podría deberse a la sustitución de dos argininas encontradas en el dominio que liga carbohidratos de otras galectinas por cisteína (R→C₅₇) y por glutámico (R→E₇₇).

k) Galectina-11

La galectina-11 (ovogal11) fue aislada y caracterizada en estómago de oveja infectada con un nematode *Haemonchus contortus*. El mRNA es inducido en el tejido gastrointestinal infectado. Por técnicas de inmunohistoquímica se observó que la proteína se localiza en el citoplasma y núcleo de las células epiteliales. Por lo tanto, se piensa que la ovogal11 estaría involucrada en la respuesta inflamatoria y probablemente en la protección contra la infección. La secuencia de aminoácidos de esta galectina muestra una homología de aminoácidos de 34% con galectina-10 de eosinófilos aunque no se detectó mRNA de ovogal11 en los mismos. Tiene baja afinidad por lactosa y aunque tiene como la galectina-10 sólo tres de los siete residuos que son importantes en la unión a carbohidratos de galectina-1, es probable que participe como una proteína ligadora de carbohidratos en interacciones célula-matriz extracelular, proliferación celular o diferenciación (Dunphy, 2000).

l) Galectina-12

Se ha caracterizado una galectina-12 que contiene dos dominios homólogos a DRC de galectinas. El extremo N terminal contiene los residuos que interaccionan con carbohidratos como en el resto de las galectinas, en tanto que en el extremo C terminal muestra considerable divergencia en la secuencia consenso y no se encuentran muchos de los residuos conservados. La proteína une lactosa probablemente con la contribución del dominio N terminal. El mRNA de galectina-12 es semejante al que codifica

proteínas regulatorias del crecimiento. El mRNA está poco expresado en muchas células y tejidos y es estimulado en células sincronizadas en la fase G1 y en G1/S del ciclo celular. La expresión ectópica de galectina-12 en células cancerosas frena el ciclo celular en G1.

Galectina-12 es entonces un regulador de la homeostasis celular (Yang et al., 2001).

m) Galectina-13

Recientemente se ha secuenciado una proteína de placenta (PP13) que tiene gran homología con varios miembros de la familia de galectinas con afinidad beta-galactosídica. La estructura secundaria de PP13 es idéntica al prototipo de galectinas y tiene el dominio de reconocimiento de carbohidrato altamente conservado. Se observó que tiene gran afinidad por N-acetil-lactosamina y lactosa típica de numerosas galectinas y que los ligandos se unían en el dominio DRC. Se demostró así que es una galectina y fue denominada galectina-13 (Visegrady et al., 2001).

n) Galectina-14

Se ha clonado una galectina de eosinófilo ovino que ha sido caracterizada como una galectina prototipo que contiene un sitio de reconocimiento de carbohidratos y tiene homología con galectina 9 que es un potente agente quimiotáctico de eosinófilos. La proteína se encuentra en el citoplasma de eosinófilos y también en el fluido broncoalveolar por acción de alérgenos, lo que podría indicar que juega un rol importante en la inflamación alérgica (Dunphy et al., 2002).

o) Otras galectinas de vertebrados

En vertebrados no mamíferos, se publicaron secuencias primarias de algunas galectinas con subunidades de PM entre 14-16 kDa: las lectinas de piel de pollo de 14 (Ohyama et al., 1986; Ohyama y Kasai, 1988) y de 16 kDa (Sakakura et al., 1990), las galectinas de anfibios tales como *Xenopus laevis* (Marschal et al., 1992) y *Bufo arenarum* (Ahmed et al., 1996). Se dispone de secuencias primarias incompletas de la lectina del órgano

eléctrico de *Electrophorus electricus*, la anguila eléctrica (Paroutaud et al., 1987), y de la lectina del ovocito de la rana *Rana catesbeiana* (Ozeki et al., 1991). En nuestro laboratorio hemos detectado y purificado la galectina de ovario del anfibio anuro *Bufo arenarum* (Fink et al., 1984; Fink de Cabutti et al., 1987), la cual se encuentra regulada durante el desarrollo embrionario (Elola et al., 1998; Elola y Fink, 1996; Elola, 1996). Esta galectina de *Bufo arenarum* ha sido cristalizada en presencia de dos disacáridos específicos como tiodigalactósido y N-acetil-lactosamina (Vasta et al., 1997).

1.1.3. Estructura cristalográfica de las galectinas

Las estructuras cristalinas de varias galectinas fueron estudiadas por difracción de rayos X. Estas lectinas son la galectina-2 de hepatoma humano (Lobsanov et al., 1993a; Lobsanov et al., 1993b), la galectina-1 de corazón bovino (Bourne et al., 1994) y la galectina-1 de bazo bovino (Liao et al., 1994) y las galectina-3 (Seetharaman et al., 1998) y -10 (Swaminathan et al., 1999).

Los estudios revelaron que estas galectinas comparten con las lectinas de legumbres, como la Concanavalina A y la de arveja, no sólo la misma topología, sino una estructura similar de lámina β , a pesar de la falta de homología de secuencias aminoacídicas. Esto sugiere una relación estructura-función conservada evolutivamente.

La estructura del cristal de la galectina-1 de bazo bovino acomplejada con N-acetil-lactosamina (Gal β 1-4GlcNAc, LacNAc) fue analizada con una resolución de 1.9 Å (Liao et al., 1994). Si bien se dispone del 90% de la secuencia primaria de esta lectina, dado que resulta casi idéntica a las de corazón y fibroblastos bovinos (Gitt y Barondes, 1991), se asumió que las secuencias de bazo y corazón son similares. Confirmando esto, las densidades electrónicas obtenidas para la galectina de bazo concuerdan con la secuencia de aminoácidos de la de corazón.

El modelo consiste de 133 aminoácidos en un monómero y de 132 en el otro, dos moléculas de LacNAc y 154 moléculas de agua. La estructura revela que existe un sitio de unión de carbohidrato por monómero y que el dímero forma un sandwich β antiparalelo de 22 hebras, con los extremos N y C terminal de cada monómero hacia la

interfase del dímero. En el sitio de unión del azúcar, la mayoría de las interacciones se forman con la Gal, y un número menor corresponden a la Glc.

Respecto a la Gal, el OH-4 axial forma dos interacciones electrostáticas claves con residuos completamente conservados entre galectinas, una con Arg-48 (numeración del aminoácido homólogo en la secuencia de la galectina-2: Arg-49) y otra con His-44 (His-45). Este OH-4 también interactúa con Asn-46 (Asn-47), pero con la participación de una molécula de agua. Los dos modelos publicados para galectina-1 y -2 coinciden en los residuos que se relacionan con el OH-4.

Respecto a la GlcNAc y su interacción con la proteína, el OH-3 contacta con Arg-48, Glu-71 y con Arg-73 (Arg-70), o sea en igual manera que lo propuesto en el modelo de Lobsanov. El átomo de N del grupo N-acetilo del C-2 está involucrado en una interacción mediada por agua con las cadenas laterales de Asp(D)-54 y de Arg-73, y con el carbonilo de la cadena principal de His-52. Además, el grupo N-acetilo interactuaría con las cadenas laterales de Arg-73 y Glu-71, por fuerzas de van der Waals. Todas estas interacciones del grupo acetilo con diferentes residuos explicarían el hecho de que la unión de galectina-1, tanto de bazo bovino como de otros orígenes, a LacNAc sea cuatro-diez veces más intensa que la de la lactosa (Leffler y Barondes, 1986; Sparrow et al., 1987; Ahmed y Vasta, 1994) (Fig. 1).

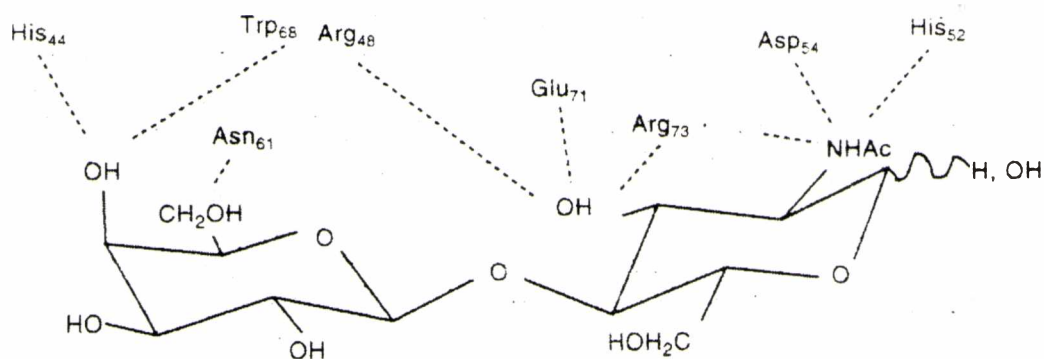


Figura 1 . Interacción de la galectina-1 de bazo bovino con N-acetil-lactosamina (Ahmed y Vasta, 1994).

Con respecto a los grupos tioles, esta galectina presenta seis Cys que en cristales recién preparados aparecen en estado reducido, pero tres de ellas se detectaron oxidadas y

solvatadas en un cristal un mes más viejo. Ninguna de las cisteínas es requerida para la unión al azúcar. Cys-60, la única que se halla cercana al sitio del carbohidrato, está reducida como la Cys-42, mientras que aquellas de las posiciones 16, 88 y 130 están oxidadas y la Cys-2 se encontró desordenada. Estos resultados coinciden con los obtenidos por mutagénesis puntual, en los que sustituciones de las Cys-60 y Cys-2 por Ser no bloquearon la interacción con azúcares .

En la Tabla 1 se comparan los modelos cristalográficos, respecto a los residuos de aminoácidos que interactúan directamente con el disacárido empleado en cada caso.

Tabla 1. Modelo cristalográfico de galectina-1

Grupo del disacárido involucrado		Tipo de unión	Galectina-1
Galactosa	OH-4	Puente de H	His-44
		Puente de H	Asn-46
		Puente de H	Arg-48
	OH-6	Puente de H	Asn-61
		Puente de H	
	OH-2		np
	OH-3	Puente de H	Asn-46
Anillo carbonado	van der Waals	Trp-68	
Glucosa	OH-3	Puente de H	Arg-48
			Glu-71
			Arg-73
	C2	Puente de H	NAC-2#: His-52
			NAC-2#: Asp-54
C2	van der Waals	NAC-2#: Arg-73 NAC-2#: Glu-71	

np: No participa.

Sustituyente N-acetilo del C-2 de GlcNAc, en LacNAc.

(Tomado de Elola y Fink, 2000a)

1.1.4. Especificidad glicídica

Las lectinas S-Lac fueron inicialmente caracterizadas como específicas para sacáridos de tipo galactósido ya que la actividad lectínica podía ser inhibida por Gal pero no por Glc, Man, Fuc u otros azúcares simples. De este modo, se esperaba que las mismas reconocieran la orientación del OH-4, rasgo característico de Gal, que es axial en esta molécula pero ecuatorial en Glc.

Leffler y Barondes (1986) estudiaron la interacción de la galectina-1 de pulmón de rata con diferentes sacáridos, demostraron que la celobiosa, disacárido idéntico a lactosa excepto por la orientación del OH-4 en el azúcar no-reductor (Gal en lactosa, Glc en celobiosa), resultaba 1.000 veces menos activa como inhibidor que la lactosa. Asimismo, derivados de lactosa con sustituyentes en la posición 4 de Gal mostraron una marcada pérdida de actividad inhibitoria. Los derivados con sustituyentes en la posición 6 de Gal también resultaron virtualmente inactivos. Contrariamente, sustituciones en las posiciones 2 y 3 de Gal de la lactosa se comportaban en forma similar a esta última.

La lactosa resultaba 130 veces más activa que Gal libre, por lo cual se supuso que la Glc presente en el disacárido contribuye a la interacción con la lectina. Sustituciones en la posición 3 de la Glc bloqueaban la actividad, indicando que la galectina interactúa con esa posición. La importancia del OH ecuatorial en la posición 3 de la Glc en la lactosa se demostró, por ejemplo, con el disacárido Gal β 1-4Fru que posee un OH-3 de ese tipo en la Fru, y una actividad inhibitoria similar a la de lactosa. El compuesto Gal β 1-3GlcNAc, esqueleto de los oligosacáridos de tipo 1 -caracterizados por poseer un enlace β 1-3 entre Gal y GlcNAc-, demostró ser un inhibidor tan potente como la lactosa, debido supuestamente a su conformación preferida. Esta conformación, determinada por resonancia magnética nuclear, presenta en la posición 4 de GlcNAc un OH ecuatorial, que se comporta como el OH-3 de Glc en la lactosa (Fig. 2). En contraste, el compuesto Gal β 1-3GalNAc, en su conformación más estable, presenta el OH-4 axial de GalNAc en el lugar del OH-3 ecuatorial de Glc en lactosa, por lo cual su capacidad inhibitoria resulta 25 veces menor que la de lactosa.

En el tiodigalactósido (Gal β 1-S-1 β Gal), la posición del OH-3 de Glc en la lactosa es mimetizada por el OH-2 ecuatorial de una de las Gal; se propuso que la mayor actividad de este compuesto respecto a la de la lactosa que se debe a la simetría molecular, que permitiría la existencia de dos sitios de unión. LacNAc fue cinco veces más activa que la lactosa, lo que indica que el grupo acetamido del C-2 en la GlcNAc contribuye a esa actividad (Fig. 2).

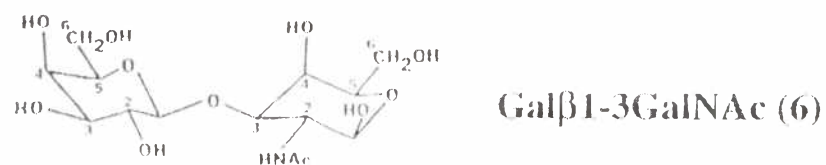
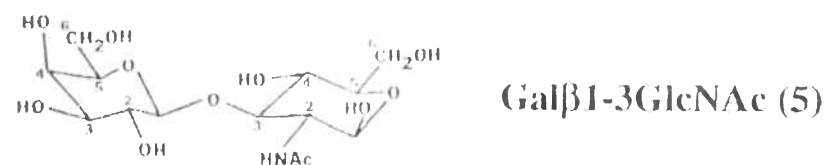
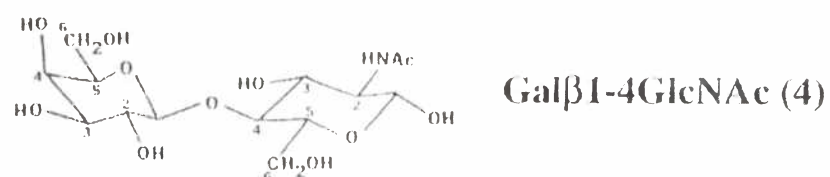
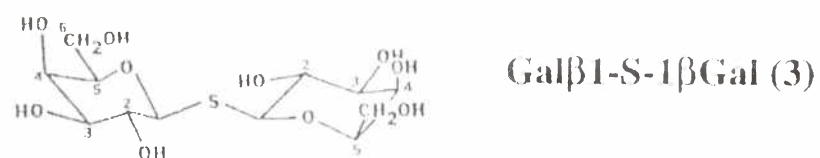
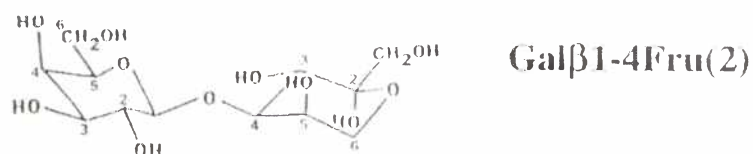
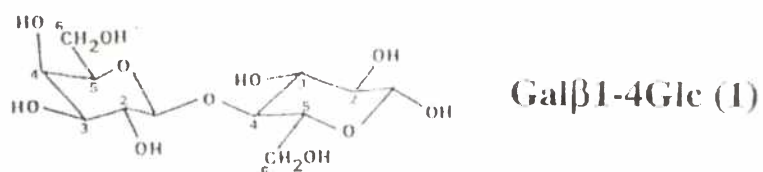


Figura 2. Conformación preferida de algunos azúcares β-galactosídicos. La conformación de los compuestos 1,4-6 está basada en estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear; en el caso del compuesto 2, esta se basa en la estructura cristalina. La conformación del tiodigalactósido (compuesto 2) es hipotética, asumiendo ángulos de torsión de las uniones glicosídicas similares a los de los otros compuestos (Leffler y Barondes, 1986).

En resumen, las posiciones 4 y 6 de Gal y el OH-3 y NAc-2 de GlcNAc se hallan orientados hacia un mismo lado de la molécula de LacNAc y constituyen los grupos responsables de la interacción galectina-ligando.

Ahmed et al. (1990) publicaron estudios de especificidad glucídica de la galectina-1 de bazo humano mediante ELISA, analizando la unión de la misma a asialofetuína que había sido adsorbida a las microplacas, en presencia de una serie de posibles inhibidores. Los autores informaron que los disacáridos que poseen residuos β -galactosídicos no reductores terminales unidos (1-3), (1-4) o (1-6) a Glc y GlcNAc fueron mejores inhibidores que la Gal libre, lo que sugiere que el sitio activo de la lectina es del tamaño de un disacárido. Asimismo, se informó la importancia del OH-4 axial de Gal, ya que Glc, GlcNAc, Man α OMe o L-Fuc que poseen ese OH ecuatorial no resultan inhibidores de galectina-1. Melibiosa (Gal α 1-6Glc) y rafinosa (Gal α 1-6Glc β 1-2Fru) dieron menor inhibición que Gal α OMe. Los disacáridos más potentes resultaron ser LacNAc y su derivado con O-metilación en C-2 de Gal (MeO-2Gal β 1-4GlcNAc): fueron 10 y 15 veces más activos que la lactosa, respectivamente .

Sustituciones con Fuc en las posiciones de los OH ecuatoriales de C-3 y C-4 de Glc/GlcNAc ([Fuc α 1-3] o [Fuc α 1-4], respectivamente) en los respectivos disacáridos Gal β 1-4GlcNAc o Gal β 1-3GlcNAc, resultan en oligosacáridos con una conformación tal que la Fuc yace por encima del esqueleto disacárido. Estos sustituyentes bloquearon a los OH-3/OH-4 de GlcNAc (este último mimetiza al OH-3, según Leffler y Barondes 1986), respectivamente, interfiriendo la interacción de los OH-4 y OH-6 de Gal con la galectina .

La afinidad de la lectina hacia oligosacáridos complejos bi-, tri- y tetra-antenarios demostró ser similar en todos los casos. Asimismo, la lectina interactuó con una secuencia tal como Gal β 1-4GlcNAc α 1-2Man α 1-6/1-3Man (presente en oligosacáridos N), o sea, no requiere estrictamente secuencias repetitivas del tipo Gal β 1-4/1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc/Glc. Como conclusión, los autores señalan que esta galectina puede unirse a la unidad Gal β 1-4/1-3GlcNAc, pero el disacárido debe estar en el extremo terminal no-reductor de oligosacáridos más largos, sean poli-LacNAc (PL) o no. Sin embargo, Merkle y Cummings (1988) demostraron que los residuos terminales

en cuestión no resultaron necesarios en la interacción entre la galectina-1 de corazón de ternero y PL, siendo las secuencias repetitivas internas más importantes .

1.1.5. Ligandos endógenos

Respecto a los ligandos descritos para galectina-1, se pueden mencionar especialmente a la laminina, las proteínas LAMP, el antígeno carcinoembrionario, las integrinas y el CD45.

Respecto a la laminina, se trata de una glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 1.000 kDa y componente fundamental de las membranas basales en diversos tipos de tejidos, es uno de los principales ligandos propuestos para galectina-1. Está compuesta por tres cadenas, la cadena A (400 kDa), la cadena B₁ (210 kDa) y la cadena B₂ (200 kDa), y posee un contenido total de carbohidratos del 12-27%. La mayor parte de los oligosacáridos hallados en esta molécula presentan enlace N-glicosídico y secuencias repetitivas disacarídicas [3Galβ1-4GlcNAcβ1]_n o de polilactosamina (PL) (Knibbs et al., 1989).

La laminina se une a diferentes macromoléculas de la membrana basal como ser a colágeno de tipo IV, al proteoglicano heparan sulfato y a sí misma. Además, interactúa con ciertos receptores de superficie celular como integrinas, el receptor de 67 kDa, otras proteínas de alto PM que ligan laminina, gangliósidos y sulfátidos. Todas estas interacciones determinan la participación de la laminina en adhesión celular, crecimiento, morfología, migración, diferenciación y metástasis. La galectina-1 de corazón de ternero marcada con [¹²⁵I] se unía a laminina sembrada sobre nitrocelulosa en ensayos de *dot-blot* con alta afinidad, demostrándose diferencias altamente significativas con respecto a la asialofetuína al cuantificar la radiactividad de cada dot (Zhou y Cummings, 1990).

También se determinó en otros experimentos que LacNAc y lactosa inhiben fuertemente la unión de la lectina a laminina . Para determinar la naturaleza de las cadenas de carbohidratos requeridos en la interacción con esta galectina, las placas de ELISA cubiertas de laminina inmovilizada fueron tratadas con endo-β-galactosidasa: este

tratamiento produjo un descenso del 60% en la interacción galectina-1 de corazón de ternero-laminina. Exoglicosidasas como α -galactosidasa, β -galactosidasa o α -fucosidasa no alteraron dicha unión, mientras que la sialidasa la intensificó (Zhou y Cummings, 1990).

Por otra parte, se efectuó la coprecipitación en solución de la galectina-1 de corazón de cerdo con laminina comercial de tumor murino (100 $\mu\text{g/ml}$), en la cual aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$ de lectina fueron requeridos para lograr el 50% del máximo de precipitación (Zhou y Cummings, 1993).

Las glicoproteínas N-glicosiladas asociadas a los lisosomas llamadas LAMP (*lysosome-associated membrane protein*)-1 y LAMP-2, que contienen PL, demostraron ser ligandos para la galectina-1 (Do et al., 1990; Shrincoosky et al., 1993) se expresan en la membrana plasmática, aunque en un nivel más bajo que en la membrana lisosomal.

Do et al. (1990) trabajaron con células CHO que tienen LAMP-1 (principal *carrier* de cadenas de poli-N-acetil-lactosamina) y resultaban intensamente aglutinadas con la galectina-1 de corazón de ternero.

Extractos de células A121 de carcinoma ovárico humano fueron purificados por cromatografía de afinidad en galectina-1 de bazo humano-Sefarosa, a los efectos de aislar glicoproteínas que fueran ligandos potenciales de la mencionada galectina (Skrincosky et al., 1993). El eluato de lactosa de esta columna fue analizado en PAGE-SDS, y transferido a nitrocelulosa. Algunos blots se incubaron con galectina-1 [^{125}I], con y sin lactosa, y se autorradiografiaron, demostrándose que la lectina se unía a una banda de 110 kDa y que la lactosa inhibía esta interacción. Otros Western blots, se sometieron a inmunoblotting con anticuerpos anti-LAMPs, obteniéndose interacción del antisuero anti-LAMP-1 con una proteína de 110 kDa. Los anticuerpos anti-LAMP-2 reconocieron una banda de PM levemente mayor. Además, se efectuó la inmunoprecipitación de LAMPs a partir de lisados de células A121 con anticuerpos policlonales anti-LAMP, analizando los complejos inmunes en PAGE-SDS, electroblotting e incubación con galectina-1 [^{125}I]: se demostró que la lectina se unía a la proteína de 110 kDa del inmunoprecipitado. Por otra parte, células viables del carcinoma de ovario se

sometieron a inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales anti-LAMP y un segundo anticuerpo conjugado a isotiocianato de fluoresceína, detectándose a LAMP-1 y -2 en la superficie de dichas células (Skrincosky et al., 1993).

En cultivos celulares KM12 de carcinoma humano de colon, se demostró que LAMP-1 y el antígeno carcinoembrionario (CEA) son los principales ligandos para esta galectina-1 (Ohannesian et al., 1994).

Diferentes autores han demostrado la participación de Lamp-1 y Lamp-2 y CD66 a y b como probables receptores de galectina-3 en neutrófilos humanos (Feuk-Lagerstedt et al., 1999).

La integrina $\alpha_7\beta_1$ es otro probable ligando de galectinas: es una proteína que une laminina, por ejemplo, en las células en diferenciación del músculo esquelético. Se expresa en etapas específicas del desarrollo de las líneas miogénicas primarias y secundarias, y se cree que funciona en la localización y expansión de los precursores celulares que originan las fibras secundarias. La interacción de la integrina con laminina y fibronectina fue demostrada en miotubos L8E63 de rata (Cooper et al., 1991) en columnas de cromatografía de afinidad de laminina y fibronectina inmovilizadas: la integrina unida se eluyó de ambas columnas por quelado de cationes con EDTA, y de la Sefarosa-fibronectina también por competición con el péptido RGDS de la fibronectina. Las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad se sometieron a inmunoblotting frente a anticuerpos monoclonales anti-cadena β_1 y anti-cadena α_7 , para la identificación. Incorporando galectina-1 recombinante de células musculares de rata (Cooper et al., 1991) a los extractos de miotubos y sembrando en las columnas de afinidad antes mencionadas se inhibió la unión de la integrina $\alpha_7\beta_1$ a laminina pero no a fibronectina (Gu et al., 1994), confirmando resultados previos (Cooper et al., 1991). Resumiendo, la integrina $\alpha_7\beta_1$ interactúa con la fibronectina, pero dicha interacción no es afectada por la galectina-1.

Asimismo, se comprobó que esta galectina puede disociar a la integrina $\alpha_7\beta_1$ de la laminina inmovilizada. Para ello, extractos de miotubos L8E63 de rata fueron sembrados en una columna de Sefarosa-laminina, eluyendo primeramente con galectina-

l. y luego con EDTA (el EDTA disocia todo complejo integrina-laminina presente). Se observó que la mayor parte de la integrina unida a la columna fue eluída al agregar 0.5 mg/ml de la galectina. Esto indicaba que la lectina puede modular la interacción de la integrina $\alpha_7\beta_1$ con la laminina (Gu et al., 1994). También, se verificó que la interacción galectina-1-integrina $\alpha_7\beta_1$ era directa e independiente de cationes divalentes en miotubos L8E63 (Gu et al., 1994).

Finalmente, se demostró que la integrina $\alpha_7\beta_1$ se une directamente a esta galectina-1. Para ello, los extractos de miotubos L8E63 se prepararon con y sin EDTA, y se sembraron en columnas de Sefarosa-galectina-1. Al obtener los eluatos con lactosa para ambos tratamientos, todas las fracciones eluídas demostraban poseer integrina $\alpha_7\beta_1$ mediante inmunoblotting con anticuerpos monoclonales anti-integrina. Así, se verificó que la interacción galectina-1-integrina $\alpha_7\beta_1$ era directa e independiente de cationes divalentes (Zhou y Cummings, 1990).

La galectina-1 de placenta humana ha sido identificada como un ligando natural del receptor tirosina-fosfatasa CD45 en células Jurkat T (Walzel et al., 1999). Se ha demostrado la unión de galectina-1 a CD45, CD43 y a CD7 en la superficie de timocitos y células de la línea T que resulta en el clustering de los receptores en un dominio único sobre la superficie celular. Los estudios efectuados indicarían que la unión de galectina-1 a CD45 estaría involucrado en la inducción de la apoptosis en células T y que el CD7 es crítico en este proceso; el rol del CD43 no está claro aún (Rabinovich et al., 2002). Aunque la viabilidad de los linfocitos es reducida por galectina-1 por disparar la apoptosis, el mecanismo por el cual se induce la misma está en investigación. El CD45 que es una molécula muy glicosilada presente en la superficie celular une galectina-1 con alta afinidad, no obstante su papel en la inducción de apoptosis es aún controversial, pues se ha observado que galectina-1 se une a células deficientes en CD45 e induce apoptosis (Fajka-Boja et al., 2002).

Las galectinas de mamíferos se unen preferentemente a glicoproteínas que contienen el disacárido N-acetil-lactosamina pero la afinidad aumenta cuando se unen a polilactosaminas y hay sutiles diferencias entre los miembros de la familia de

galectinas que podrían ser responsables de distintas respuestas biológicas (Rabinovich et al., 2002).

1.1.6. Secreción por vía no clásica

La externalización de la galectina-1 fue demostrada en cultivos de células C2 de músculo de ratón y en tejido de músculo de ratón adulto (Cooper y Barondes, 1990). Por inmunohistoquímica, se detectó reactividad intensa en diafragma de ratón, utilizando anticuerpos anti-galectina-1 de pulmón de rata. La galectina-1 se localizó en la matriz extracelular alrededor de miofibrillas individuales en el músculo diferenciado (Cooper y Barondes, 1990). Para investigar el proceso de secreción, se evaluó la localización de la lectina por inmunofluorescencia en mioblastos cultivados sobre cubreobjetos, según la misma metodología antes descrita para cortes congelados; al inducirse la diferenciación, se observó una concentración de galectina-1 en el citoplasma cortical cercano a la membrana plasmática. Progresivamente, la galectina se visualizó en dominios más restringidos del ectoplasma, que parecen, luego, evaginarse en protrusiones de la membrana plasmática y separarse para formar vesículas extracelulares ricas en lectina (Cooper y Barondes, 1990). En cultivos con miotubos multinucleados en formación, se observó la concentración de galectina-1 en el ectoplasma de miotubos jóvenes, mientras que en miotubos más maduros el citosol apareció desprovisto de fluorescencia, y ésta se evidenció en algunas protuberancias que sobresalían hacia el exterior. Un día después de la inducción de la fusión, las vesículas libres ricas en lectina resultaron abundantes, aunque no todas ellas presentaron marcación.

Así, mediante este mecanismo secretorio novedoso, se explicaría la externalización de la galectina-1 citosólica que carece de secuencia señal de secreción. La externalización inusual de la galectina-1 podría prevenir la asociación de ésta con glicoconjugados complementarios que se estarían procesando en vesículas secretorias normales. Así, esta vía alternativa de exportación sería crítica para evitar la interacción de la lectina con glicoproteínas tales como la laminina en los compartimientos intracelulares, postergándola hasta después de la liberación (Cooper y Barondes, 1990).

Los estudios de localización y externalización en los mencionados mioblastos fueron confirmados por tinción inmunofluorescente, utilizando anticuerpos anti-galectina-1 de tejidos embrionarios de ratón, y por microscopía confocal, que hace posible enfocar en fluorescencia a diferentes niveles (Harrison y Chesterton, 1980). La superficie de los mioblastos mostró contornos celulares y protrusiones citoplasmáticas muy finas o microespículas con fuerte tinción fluorescente. El citoplasma de los mioblastos permitió visualizar a la lectina distribuida por todo el citosol, pero ausente en el núcleo. La superficie de los miotubos resultó con cierta marcación, y presentó vesículas muy brillantes de lectina, que se observaron, ocasionalmente, libres en la matriz extracelular. El citoplasma de los miotubos mostró una marcación débil y difusa, con algunas áreas de mayor tinción, donde se detectaron las vesículas emergiendo (Harrison y Chesterton, 1980).

1.1.7. Roles biológicos de las galectinas

Las lectinas animales fueron motivo de estudio en las últimas décadas porque actuarían mediando en el reconocimiento celular en diversos sistemas biológicos dada su conservación evolutiva y la amplia distribución tisular dentro de cada especie. Funcionan en la modulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Barondes, 1984a); la mediación de la adhesión celular de leucocitos al endotelio por medio de las lectinas tipo C como las selectinas (Lasky, 1992); también interactúan con células o con glicoconjugados extracelulares influenciando la adhesión, migración, quimiotaxis, proliferación, apoptosis y elongación de neuritas (Barondes et al., 1994b). Además muchas lectinas animales se unen a otras estructuras distintas de los carbohidratos por interacciones proteína-proteína, proteína-lípido o proteína-ácido nucleico. Han sido involucradas en la primera línea de defensa contra agentes patógenos, metástasis, inmunorregulación y prevención de autoinmunidad (Kilpatrick, 2002).

Las actividades biológicas de las galectinas se relacionan con su capacidad de formar uniones multivalentes pues en la mayoría de los casos poseen dos sitios de reconocimiento de carbohidratos y son, por lo tanto, bivalentes. Por ejemplo galectina-1 es dimerica, se une a receptores en la membrana celular y los mismos forman clusters

separados sobre la superficie celular de linfocitos T induciendo las señales que conducen a la apoptosis; la galectina-1 monomérica no es activa en estos sistemas (Fred-Brewer, 2002).

Dentro de la familia de galectinas, las galectinas-1 y -3 han sido las más estudiadas. En el caso de galectina-1, existen evidencias respecto a la propiedad de dicha proteína de promover o inhibir la adhesión celular, de regular la proliferación celular ya sea como factor de crecimiento negativo o como mitógeno, y de inducir apoptosis. La galectina-3 puede estimular o inhibir la adhesividad celular, participa en el procesamiento del precursor del ARNm, en la transformación metastásica y en la colonización bacteriana en mucosas como el lumen intestinal (Barondes et al., 1994b); mediante la unión a IgE y al receptor de ésta, la galectina-3 puede desencadenar la activación de mastocitos/basófilos, neutrófilos y eosinófilos, jugando roles en la inflamación alérgica, y la defensa frente a infecciones microbianas y parasitarias (Liu, 1993; Truong et al., 1993a). Se ha observado que la galectina-3 juega un rol en la reepitelización de heridas, siendo su acción más rápida que la de otros factores de crecimiento utilizados en la actualidad para ese fin (Cao et al., 2002). En algunos casos la misma galectina actúa promoviendo o inhibiendo el crecimiento celular dependiendo de la dosis y el tipo celular; es probable que cada tipo de célula exprese sus propios ligandos de galectinas y se obtengan diferentes señales luego del tratamiento con las mismas (Yang y Liu, 2003).

En neutrófilos humanos, Truong et al. (1993b) demostraron el rol de la galectina-3 en la activación IgE-dependiente del estallido respiratorio por quimioluminiscencia. Por otra parte, Yamaoka et al. (1995) observaron una inducción en la producción de superóxidos al efectuar tratamientos con galectina-3, en presencia de citochalasina B y según las dosis de galectina, lo cual fue inhibido por lactosa. Posteriormente, se demostró en monocitos humanos que la galectina-3 estimula la producción de superóxidos, en presencia de citochalasina B, con niveles máximos de estimulación que corresponden al 16% del obtenido con forbol 12-miristato13-acetato (PMA), un potente activador de monocitos y neutrófilos (Liu et al., 1995). De esta manera, la galectina-3 tiene efectos proinflamatorios y resulta ser un activador del estallido respiratorio de los neutrófilos y monocitos humanos, al igual que otros estimulantes no particulado como el péptido formil-metionin-leucil-fenilalanina (fMLP), que mimetizan los efectos producidos por los microorganismos. La galectina-1 ha sido asociada con la supresión del edema

inducido por PLA₂ de veneno de abeja , inhibición de la extravasación de PMN y de la degranulación de mastocitos (Rabinovich et al., 2002).

En estudios recientes se ha demostrado que galectina-1 controla la infección intracelular inhibiendo la actividad microbicida en los macrófagos , promoviendo la replicación del parásito o induciendo la apoptosis de la célula huésped: se ha visto que en pequeñas concentraciones puede bloquear la producción de citoquinas como la IL-12 necesaria para inducir la muerte mediada por óxido nítrico del *Trypanosoma cruzi* dentro de macrófagos murinos (Rabinovich et al., 2002).

Cabe destacar que se demostró también el efecto de ciertas lectinas de plantas como concanavalina A y fitohemaglutinina (Cohen et al., 1980) y la aglutinina extraída de muérdago (*Viscum album*) (Timoshenko y Gabius, 1993) en la activación del neutrófilo humano medido como consumo de O₂ y/o formación de superóxidos y agua oxigenada. Asimismo, se comprobó que cuando los neutrófilos son pretratados con la lectina concanavalina A y luego incubados con la aglutinina de *Viscum album*, se obtiene un aumento significativo de la estimulación (Timoshenko y Gabius, 1993). Además tiene un efecto inmunomodulador y tiene capacidad antitumoral y de agregar las células sanguíneas humanas (PMN, células mononucleares y eritrocitos). Almkvist et al. (2002) demostraron que galectina-1 recombinante humana se une y activa el estallido respiratorio en neutrófilos homólogos o sea que tendría funciones proinflamatorias.

Respecto a la degranulación de los neutrófilos, ésta implica la fusión entre el fagosoma primario y los gránulos presentes en el citoplasma del fagocito. Estos gránulos contienen diferentes enzimas que participan en la muerte y degradación de los microorganismos. Timoshenko et al. (1995) demostraron que la galectina de 16 kDa de pollo estimula la liberación de la enzima lisozima a partir de los gránulos de neutrófilos humanos tratados con citochalasin B. Otros activadores del neutrófilo como PMA producen también liberación de lisozima de los gránulos específicos (Repine et al., 1974).

Los roles biológicos de las galectinas continúan siendo materia de discusión. En esta tesis evaluamos los efectos de la galectina-1 sobre la actividad de los neutrófilos y postulamos una probable contribución de la misma a la defensa frente al ataque de

patógenos, probablemente mediando la potenciación/amplificación de la respuesta inflamatoria y la ingesta y muerte de microorganismos.

En porcinos, estos roles biológicos podrían aportar beneficios en el área zootécnica; por ejemplo, una estimulación de la expresión endógena de galectinas podría tener efectos antimicrobianos en determinadas patologías.

1.2. El neutrófilo

Hay evidencias de que las galectinas están involucradas en la adhesión a endotelios y en la función de las células inflamatorias, en particular los neutrófilos. Por lo antes mencionado y porque se estudian los aspectos de galectina-1 en PMN, a continuación se describe la estructura y funciones de estas células.

Los neutrófilos junto con los monocitos presentes en sangre y los macrófagos tisulares son los fagocitos profesionales en defensa contra los microbios.

La fagocitosis es el proceso por el cual los organismos unicelulares internalizan los nutrientes. Hace aproximadamente un siglo que Metschnikoff (1883) dedujo que las células fagocíticas protegían a los organismos superiores contra las infecciones (Stossel, 1974).

Los leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN) fueron descubiertos por Paul Ehrlich en 1879 cuando se comenzaron a utilizar técnicas de fijación y coloración, que permitieron la identificación del núcleo lobulado y de los gránulos que diferenciaban eosinófilos, basófilos y neutrófilos. Estos últimos se caracterizan por teñirse con una mezcla de colorantes básicos y ácidos.

1.2.1 Producción y distribución en compartimientos

Los neutrófilos son producidos en la médula ósea a partir de células precursoras y por un proceso de proliferación y maduración se diferencian desde las células madres pluripotentes, a través de una serie de progenitores cada vez más diferenciados o células

formadoras de colonias (CFU), para granulocitos y monocitos (CFU-GM) y CFU para granulocitos (CFU-G) que dan origen a los neutrófilos maduros (Ford Bainton, 2001; Babior y Golde, 2001).

Hay hormonas hematopoyéticas que estimulan las células progenitoras; se denominan factores estimulantes de colonias (CSF) y en el caso de la producción de neutrófilos se han descrito al menos cuatro: GM-CSF, una glicoproteína de 22 kDa que actúa en la producción de neutrófilos, monocitos y eosinófilos; la G-CSF 20 kDa, que estimula sólo neutrófilos, es un regulador crítico en la producción de los mismos y la presencia de anticuerpos contra G-CSF lleva a profundas neutropenias; interleukina-3 (IL-3) con 20 kDa que actúa tempranamente en la hematopoyesis sobre células multipotentes y finalmente el c-kit o *stem cell factor* de 28 kDa que actúa en combinación con IL-3 o GM-CSF estimulando precursores tempranos.

A partir de las CFU, por acción de las hormonas hematopoyéticas, se llega al mieloblasto que es la primera célula de la progenie que puede ser reconocida por la coloración panóptica al microscopio óptico. Luego se sucede una serie de modificaciones en el citoplasma, aparecen gránulos en el estadio de promielocito, la cromatina se condensa y el núcleo se transforma en polilobulado para llegar al neutrófilo segmentado maduro.

En la progenie de los neutrófilos se distinguen las siguientes células en orden de madurez creciente: promielocito → mielocito → metamielocito → neutrófilo en banda → neutrófilo segmentado (Fig. 3).

Durante el proceso de maduración se producen cambios en marcadores superficiales y en el citoesqueleto. Aparecen receptores de membrana como el receptor de Fc que está pobremente expresado en células inmaduras y está presente en el 90% de las células maduras, así como receptores para fragmentos del componente del complemento C3 llamados CR1 y CR3. También ocurren cambios en el citoesqueleto como aparición de microtúbulos y cambios biofísicos que permiten la deformabilidad del neutrófilo que es importante para su funcionamiento.

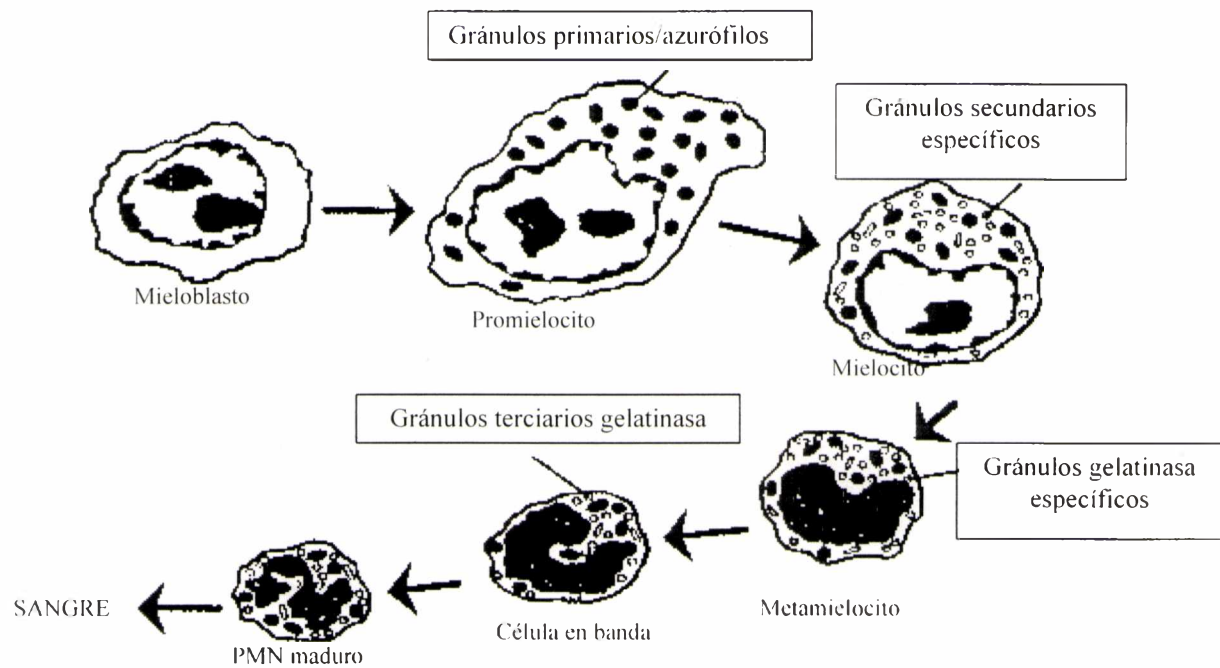


Figura 3. Diagrama de estadios de maduración de PMN (tomado de Ford Bainton, 2001).

Además, desaparecen algunas integrinas de membrana como $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, presentes en las células CD34+, que permiten la interacción con el microambiente medular. Además ya en la GM-CFU se puede detectar la presencia de L-selectina de la familia de moléculas de adhesión que se encuentra en los neutrófilos maduros. Los neutrófilos maduros también sintetizan y secretan interleukina-1 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Son almacenados en la médula hasta que son liberados a la circulación sanguínea en donde tienen una vida media de 6,7 horas (4-10 horas). Luego entran en los tejidos y probablemente viven uno o dos días hasta que mueren por apoptosis o se pierden a través de la mucosa del tracto intestinal.

Hay evidencias de que los neutrófilos envejecidos sufren apoptosis y la fagocitosis de los granulocitos apoptóticos por los macrófagos tisulares puede prevenir la liberación de su contenido, altamente tóxico, en el espacio extracelular; lo mismo que ocurre en la resolución del proceso inflamatorio.

Así los neutrófilos y sus células progenitoras se distribuyen en varios compartimientos conectados entre sí: médula, sangre periférica y tejidos.

En la médula se encuentran en dos compartimientos: a) compartimiento mitótico o proliferativo donde hay un número pequeño de células progenitoras inmaduras y mieloblastos, promielocitos y mielocitos y b) compartimiento de maduración y almacenamiento donde se encuentran metamielocitos, neutrófilos en banda y neutrófilos maduros que se almacenan en médula y constituyen una reserva que es mayor que la cantidad de neutrófilos en circulación.

Los neutrófilos dejan la médula y entran en la sangre sin reingresar en la médula. Aproximadamente la mitad están libres en la circulación y los otros se ubican sobre los endotelios de los pequeños vasos constituyendo el pool marginal. Hay un intercambio libre entre ambos compartimientos.

Los neutrófilos del pool marginal pueden pasar a la circulación por estrés o por el ejercicio y normalmente una parte entra en los tejidos en flujo unidireccional, es decir no regresan a la sangre. Normalmente migran a pulmones, cavidad oral, tracto gastrointestinal, hígado y bazo. Pueden perderse por descamación de las mucosas o morir en los tejidos por apoptosis y son degradados por macrófagos: el tiempo de vida media es corto, pero alguna célula puede sobrevivir hasta dos semanas.

1.2.2. Composición y metabolismo del neutrófilo maduro

Aproximadamente el 82% del peso de los neutrófilos es agua (Beutler, 2001). En relación a los hidratos de carbono es una célula rica en glucógeno. La concentración de aminoácidos es mayor que en el plasma circundante; el contenido de proteínas es de $74,2 \pm 3,1 \text{ mg}/10^9$ células compuestas por proteínas estructurales de la matriz, proteínas requeridas para la locomoción y proteínas de adhesión y quimiotácticas; además de las proteínas contenidas en gránulos con funciones bactericidas, hidrolíticas e inflamatorias.

El 5% del peso húmedo de los neutrófilos está formado por lípidos de varias clases entre los que se destacan los fosfatidilinosítoles, que son importantes porque son fuente de inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) que es un mediador de la liberación de calcio y diacilglicerol (DAG) que activa la proteinquinasa C.

La principal fuente de energía en el neutrófilo es la vía glicolítica. La velocidad de la glicólisis no se altera durante la fagocitosis, pero los niveles de ATP que son normalmente de $1,9 \text{ nmol}/10^6$ células cae a $0,8 \text{ nmol}/10^6$ células. Los neutrófilos también metabolizan la glucosa por la vía de la hexosa monofosfato que es la vía que provee del NADPH necesario para la generación de los agentes superóxidos.

En cuanto al metabolismo de nucleótidos, los neutrófilos son capaces de sintetizar pirimidinas, pero no purinas. La presencia de ribonucleasas y desoxirribonucleasas en los gránulos de los neutrófilos sugiere que estas organelas están involucradas en la destrucción de ácidos nucleicos endógenos y/o exógenos.

En los neutrófilos humanos se encuentra c-AMP. Cuando se exponen los neutrófilos a agentes inflamatorios como oligopéptidos formilados o inmunocomplejos se observa un aumento transitorio de cAMP (2-5 minutos).

En los neutrófilos está activa la vía del ácido fosfatídico que incorpora ácidos grasos en lípidos neutros. Además también se produce la incorporación de ácidos grasos en lisofosfolípidos, que lleva a la formación de diacilglicerol, fosfatidilcolina y diacilfosfoetanolamina. En la fagocitosis se triplica la acilación de lisolecitina exógena lo que aumenta el contenido de fosfolípidos. En neutrófilos humanos se detecta la presencia de enzimas con actividades lipolíticas como hidrolasas y varias fosfolipasas que se activan en neutrófilos estimulados y producen mediadores lipídicos y señales diversas.

El ácido araquidónico se libera a partir de fosfolípidos por acción de fosfolipasa A2 que se activa por la exposición de neutrófilos a factores quimiotácticos o zimosan opsonizado o ionóforos de calcio. El ácido araquidónico por acción de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa produce mediadores químicos que juegan roles importantes en la regulación de respuestas biológicas (Fig. 4).

Las prostaglandinas que se producen son mediadores en el proceso inflamatorio dilatando y permeabilizando los pequeños vasos dando lugar a edema y eritema. El tromboxano es un agente quimiotáctico. También se producen leucotrienos que son mediadores importantes en la respuesta inflamatoria y el leucotrieno A₄ (LTA₄) se

hidroliza y genera el leucotrieno B₄ (LTB₄) que es un factor quimiotáctico potente y activador de neutrófilos. También se producen otros mediadores como el 5-HPETE que tiene propiedades quimiotácticas y estimulan la liberación de lisozima de los neutrófilos (Fig. 4).

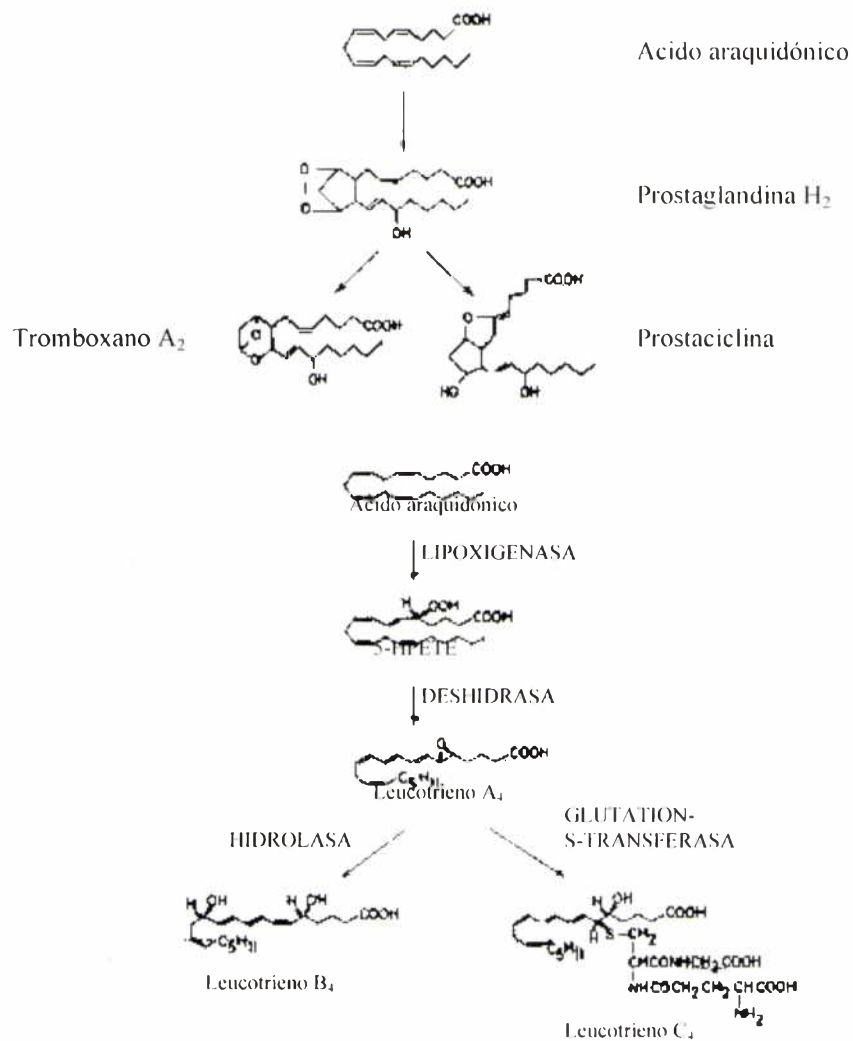


Figura 4. Producción de mediadores del ácido araquidónico. Arriba el tromboxano A₂ y prostaciclina. Abajo producción de leucotrieno A₄, B₄ y C₄. (Beutler, 2001)

1.2.3. Gránulos y vesículas secretoras de los neutrófilos

a) Clasificación y composición

Durante la mielopoyesis se sintetizan proteínas que son almacenadas en gránulos citoplasmáticos.

Los gránulos se forman en general por el agregado de un número finito, pero variable, de pequeñas vesículas de transporte que contienen las proteínas recién sintetizadas en el aparato de Golgi (Borregaard y Cowland, 1997)

Se pueden distinguir dos tipos de gránulos por su afinidad por los colorantes: gránulos azurófilos que toman el colorante básico azul A debido a su contenido en mucopolisacáridos y gránulos específicos que no se colorean.

Se ha observado, con estudios de hibridación *in situ*, que en el estadio de promielocito comienza la síntesis de mieloperoxidasa (MPO) (Borregaard et al., 1993), que es un marcador de los gránulos azurófilos. Mediante la reacción de peroxidasa se observan al microscopio electrónico numerosos gránulos grandes en su mayoría esféricos (500 nm de diámetro) y algunos pequeños y conectados entre sí por filamentos.

En el siguiente estadio de mielocito neutrófilo, aparecen los gránulos específicos o secundarios que son peroxidasa negativos, de tamaño y forma variable, esféricos (200 nm) o alargados (130x1000 nm) y coincide con la aparición de mRNA para lactoferrina (Borregaard et al., 1993); en este estadio desaparece la mieloperoxidasa del retículo endoplásmico rugoso y del Golgi y la producción de gránulos azurófilos decae.

En los estadios más maduros que corresponden a metamielocitos, neutrófilos en banda y neutrófilos segmentados hay una población mixta de gránulos: con microscopía electrónica se distinguen aproximadamente 200 a 300 por célula, de los cuales un tercio son peroxidasa positivos.

En los últimos 15 años, con técnicas de fraccionamiento subcelular combinadas con inmunomicroscopía electrónica y citometría de flujo, se ha demostrado que los gránulos de los neutrófilos son heterogéneos. Además se ha encontrado una organela denominada vesícula secretora.

Estos gránulos y vesículas secretoras contienen enzimas proteolíticas y son también importantes reservorios de receptores y proteínas de membrana que se incorporan a la membrana del neutrófilo activado (Borregaard y Cowland, 1997).

Los gránulos se pueden clasificar por el contenido en MPO, pero pueden ser subdivididos en base a otras proteínas intragranulares.

Tabla 2. Contenido de los gránulos y vesículas secretoras de PMN humanos

	Gránulos azurófilos	Gránulos específicos	Gránulos de gelatinasa	Vesículas secretoras
Membrana	CD63 CD68 H ⁺ -ATPasa tipo V	CD11b Antígenos CD15 CD66 CD67 Citocromo b ₅₅₈ fMLP-R Fibronectina R G-proteína, subunidad Laminina- α Antígeno NB 1 Proteína 19-kDa Proteína 155-kDa Rap1, Rap2 SCAMP Trombospondina-R TNF-R Activador-R de plasminógeno tipo uroquinasa VAMP-2 Vitronectina-R	CD11b Citocromo b ₅₅₈ Enzima diacil-glicerol-deaciladora fMLP-R SCAMP Activador-R de plasminógeno tipo uroquinasa VAMP-2 H ⁺ -ATPasa tipo V	Fosfatasa alcalina CRI Citocromo b ₅₅₈ CD11b CD14 CD16* fMLP-R SCAMP Activador-R de plasminógeno tipo uroquinasa H ⁺ -ATPasa tipo V VAMP-2 CD10, CD13, CD45* Receptor C1q* DAF*
Matriz	β -glicerofosfatasa ácida Mucopolisacárido ácido α_1 -Antitripsina α -Manosidasa Azurocidina/CAP37/proteína ligante de heparina Proteína incrementante de permeabilidad bactericida β -Glicerofosfatasa β -Glucuronidasa Catepsinas Defensinas Elastasa Lisozima Mieloperoxidasa N-acetil- β -glucosaminidasa Proteinasa-3 Sialidasa Proteína-ubiquitina	β_2 -Microglobulina Colagenasa Gelatinasa hCAP-18 Histaminasa Heparanasa Lactoferrina Lisozima NGAL Activador-R de plasminógeno tipo uroquinasa Sialidasa SGP28 Proteína ligante a vitamina B ₁₂	Acetiltransferasa β_2 -Microglobulina Gelatinasa Lisozima	Proteínas plasmáticas (incluyendo tetranectina)

* Esta localización se basa en la cinética de regulación, en respuesta a estimulación con mediadores inflamatorios, pero no ha sido demostrada todavía por localización subcelular por inmunocitoquímica.

Los gránulos peroxidasa positivos (gránulos azurófilos o primarios) se caracterizan por tener MPO y se subdividen en gránulos grandes ricos en defensina y gránulos pequeños pobres en defensina.

Los gránulos peroxidasa negativos son elípticos o esféricos y se dividen en específicos o secundarios y gránulos de gelatinasa o terciarios en base a su contenido relativo de lactoferrina y gelatinasa. Todos los gránulos contienen lisozima (Tabla 2).

Las vesículas secretoras tienen forma de bastón y se movilizan rápidamente incorporando la integrina $\beta 2$ o Mac-1 ($\alpha m\beta 2$, CD11b/CD18) a la membrana plasmática en el PMN activado. Su membrana es rica en receptores y contienen en su interior proteínas plasmáticas. El marcador es la albúmina, por eso se piensa que su origen es endocítico (Tabla 2).

Se han identificado recientemente tres proteínas en los gránulos específicos que podrían tener gran importancia en la función del neutrófilo:

- **NGAL** en neutrófilos humanos (se llama así porque compleja gelatinasa), es un miembro de la familia de las lipocalinas (25-30kD) que unen sustancias lipofílicas como el retinol. Se induce su síntesis en neutrófilos de sangre periférica tratados con GM-CSF. En los estudios realizados para localizar el receptor de fMLP se identificó a NGAL como la proteína de 25kD que une fMLP y la hipótesis es que esta proteína puede participar en la regulación de la respuesta inflamatoria uniendo pequeños mediadores lipofílicos como fMLP, factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB₄) y lipopolisacáridos (LPS) (Borregaard y Cowland, 1997).
- **hCAP-18** que pertenece a la familia de las catelicidinas que son péptidos bactericidas, se encuentra intacta en los gránulos específicos de los neutrófilos de rumiantes. El extremo N-terminal 14kD tiene homología con la catelina que se aisló de neutrófilos porcinos, mientras que el extremo C-terminal tiene gran diversidad de 12 a 100 aminoácidos, algunos son ricos en prolina y arginina y es altamente catiónico. En la degranulación de gránulos específicos y azurófilos por acción de la elastasa el extremo C-terminal se puede clivar y se producen péptidos con acción bactericida y también tóxicos para las células de eucariotes (Radermacher et al., 1993).

- **SGP28** (28 kDa) es una glicoproteína de los gránulos específicos, rica en cisteínas, y tiene gran homología con proteínas de plantas que se cree son importantes en la resistencia a virus, bacterias y hongos (Rademacher et al., 1993).

En PMN de muchos animales se han encontrado péptidos antimicrobianos de diferentes clases estructurales. En extractos de PMN de porcino se han purificado protegrinas PG1, PG2 y PG3 que son péptidos de 16-18 aminoácidos. En estudios realizados por Panyutich et al (1997) se encontró que las protegrinas se almacenan en neutrófilos en proformas inactivas que son clivadas por la elastasa de los mismos produciendo protegrinas maduras durante la preparación de los lisados de gránulos y durante la secreción de los gránulos estimulada por PMA de PMN intactos. La secreción de protegrinas en porcinos en concentraciones pequeñas (1-10µg/ml) y trazas de elastasa confieren actividad microbicida en fluidos inflamatorios libres de células frente a la *Listeria monocytogenes*.

b) Funciones de los gránulos

Los gránulos funcionan interrelacionados, la generación de metabolitos reactivos del oxígeno depende de los componentes de los gránulos peroxidasa-negativos (que proveen flavocitocromo b₅₅₈) y de los gránulos azurófilos que contienen MPO y transforma el H₂O₂ en ácido hipocloroso en presencia de cloruros; además las proteasas de los gránulos azurófilos pueden activar las catelicidinas (gránulos específicos) removiendo el extremo N-terminal que inhibe su acción. También los gránulos azurófilos liberan elastasa que convierte a la gelatinasa (gránulos específicos) y colagenasas en sus formas activas (Borregaard y Cowland, 1997).

1.2.4. Morfología y recuentos de neutrófilos en porcino

Los neutrófilos maduros teñidos presentan un núcleo púrpura oscuro polilobulado y el citoplasma color azul pálido contiene gránulos finos de color rosado. El recuento total de leucocitos al nacimiento en cerdos miniatura es de $9.0 \pm 4.4 \times 10^3 / \mu\text{l}$, aumenta progresivamente hasta los 3 meses de vida y luego decae hasta los tres años en que se estabiliza. La relación neutrófilo:linfocito es de 53.5:43.3. Una semana después del

nacimiento la relación se invierte y los linfocitos predominan durante el resto de la vida (Loeb et al., 1978).

En cerdos miniatura los datos encontrados para animales de 3-12 meses fueron: leucocitos totales $17.8 \pm 4.6 \times 10^3 / \text{mm}^3$, para neutrófilos $21.0 \pm 10.0\%$, para linfocitos $74.0 \pm 10.0\%$, para los eosinófilos $3.0 \pm 3.0\%$ (Tegeris et al., 1966; Loeb et al., 1978).

1.2.5. Función del neutrófilo

El neutrófilo es una célula altamente diferenciada y especializada. Es la más numerosa de las células fagocíticas en el hombre y filogenéticamente es anterior al linfocito. Tiene un rol central en la fase aguda de la respuesta inflamatoria. Se movilizan rápidamente al sitio de infección bacteriana o injuria tisular donde liberan el arsenal antimicrobiano constituido por enzimas proteolíticas contenidas en sus gránulos y enzimas capaces de producir metabolitos del oxígeno que son altamente tóxicas e inespecíficas, por lo que es crucial que no sean liberadas por el neutrófilo en la circulación.

La exposición del neutrófilo a una variedad de estímulos particulados o solubles provoca una serie de respuestas que incluyen quimiotaxis, adhesión, fagocitosis, degranulación, generación de productos reactivos del oxígeno, intermediarios del nitrógeno (óxido nítrico, radical peroxinitrilo (ONOO^\cdot), NO_2 etc.), entre otras.

El neutrófilo ejerce principalmente su función a través de la fagocitosis (Fig. 5). Es atraído por agentes quimiotácticos en concentraciones menores que las requeridas para la respuesta citotóxica (degranulación o activación del estallido respiratorio) y reconocen receptores en la superficie del neutrófilo que son continuamente internalizados. Durante la locomoción adquiere una forma asimétrica: se forma un pseudopodio como consecuencia de un rearrreglo del citoesqueleto que avanza hacia adelante, tiene forma cilíndrica y crece a velocidad constante y después de adquirir un máximo de extensión se retrae aun en presencia de quimiotácticos. En trabajos en neutrófilos humanos activados con fMLP se ha visto que la velocidad de expansión depende de la concentración del activador en la vecindad de la parte anterior del pseudopodio y de la temperatura (Zhelev et al., 1996); los gránulos migran hacia el

pseudopodio; el núcleo tiende a permanecer en la parte posterior. Mientras que la formación de pseudopodios no requiere la presencia de una superficie, el neutrófilo para moverse se adhiere reversiblemente al sustrato y algunas proteasas presentes en la superficie del mismo pueden estar involucradas en la unión con la matriz extracelular (Dinauer, 1998).

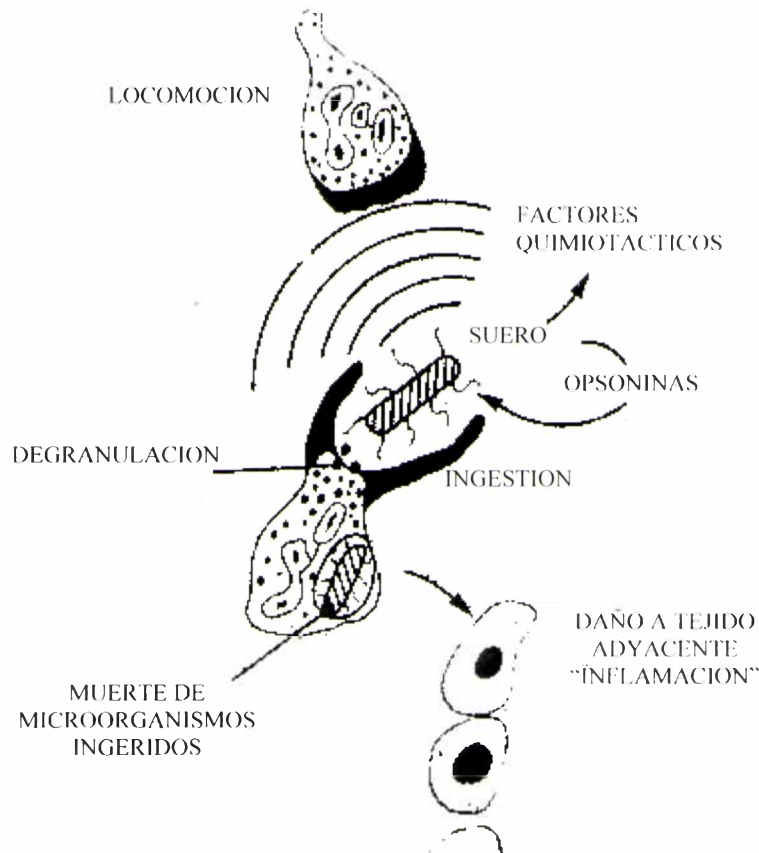


Figura 5. Fagocitosis (Smolen and Boxer, 2001).

La corteza del neutrófilo rica en actina juega un rol importante en la quimiotaxis y en la fagocitosis. En los neutrófilos en reposo 30-50% de las moléculas de actina están en la forma F o filamentososa y es el desplazamiento del equilibrio hacia la forma de monómero G (globular) lo que controla la movilidad y la fagocitosis. Durante este proceso el citoplasma próximo a la membrana plasmática en el pseudopodio pasa de un líquido viscoso a una estructura rígida de filamentos de F-actina y es regulado por señales moleculares intracelulares. Por ejemplo, el nivel de calcio citosólico que aumenta en el neutrófilo activado actúa sobre la gelsolina promoviendo la desagregación de la actina por el clivaje de filamentos y el *capping* de los terminales, éste es un paso esencial en el movimiento del neutrófilo inducido por quimiotácticos.

También se ha observado en lisados obtenidos de neutrófilos, la actividad de una β_2 -proteína, de alta afinidad e independiente de calcio que se asocia con el *capping* de actina y es análoga a otras proteínas observadas en músculo estriado de vertebrados (DiNubile et al., 1995).

Las citochalasinas inhiben la fagocitosis y el desplazamiento de los neutrófilos. En estudios recientes en células intactas se ha observado que la citochalasina D (metabolito de hongos) aumenta el contenido de F-actina, sugiriendo que se destruye la red del citoesqueleto y aumenta el número de terminales de actina disminuyendo la tensión cortical y la viscosidad citoplasmática. La citochalasina B reduce la tensión y la viscosidad del citoplasma en una forma dosis dependiente pero es la menos potente de las citochalasinas y no tiene efecto sobre el contenido de F-actina (Ting-Beall et al., 1995). Por otro lado el ensamblaje de la actina se estimula por la acumulación de fosfoinositol liberado por los fosfolípidos de membrana alrededor de un receptor activado. Esto ocurre durante la extensión del pseudopodio, pero no es un proceso totalmente conocido.

En la exposición de los neutrófilos a agentes quimiotácticos y partículas opsonizadas se observa un rápido aumento del cAMP en el sitio de contacto de la partícula con la membrana plasmática antes que la partícula sea fagocitada y en sitios adyacentes del fagosoma no así en el resto del citoplasma. Esta compartimentalización del cAMP es probablemente una señal importante para la iniciación de la fagocitosis (Pryzwansky et al., 1981). También puede estar involucrado en la disminución de la actividad proinflamatoria del neutrófilo al restaurar la homeostasis del calcio en los mismos por un aumento de la actividad de la Ca-ATPasa de membrana cAMP dependiente (Mahomed et al., 2000).

a) Opsonización y fagocitosis

Para facilitar el reconocimiento de las bacterias o partículas por la célula fagocítica, las mismas son cubiertas con opsoninas séricas que pueden ser fragmentos proteolíticos del complemento (C3b y C3bi) o inmunoglobulinas específicas (IgM, IgG_y, IgG₃). Las opsoninas son reconocidas por receptores de tipo Fc y C3b presentes en la superficie del

PMN. Los Fc unen IgG y tienen varios subtipos, la respuesta celular es gobernada por el dominio citoplasmático del subtipo de Fc γ , en algunos casos se activa el estallido respiratorio (como en la unión de IgG a Fc γ RI y Fc γ RII) y en otros la degranulación como en la unión a Fc γ RII y Fc γ RIIB. El receptor de C3b (CR1) es de alto peso molecular es una glicoproteína que muestra heterogeneidad de tamaño porque hay 4 alelos en el hombre y su unión con el C3b inicia la ingestión de la partícula opsonizada. El receptor de C3bi (CR3) es la β 2 integrina Mac-1 (CD11b /CD18) , la unión con C3bi dispara la fagocitosis y el estallido respiratorio (Dinauer, 1998).

Cuando el neutrófilo entra en contacto con la partícula o bacteria opsonizada a través del receptor se inicia la fagocitosis, el pseudopodio la reconoce, se fusiona, se adhiere firmemente y se mueve sobre la misma formando el fagosoma que incluye a la partícula. En estudios físicoquímicos *in vitro* realizados con PMN humanos, se ha observado que la opsonización de las partículas de *Saccharomyces cerevisiae* aumenta el ángulo de contacto con las células fagocíticas y consecuentemente las interacciones hidrofóbicas, así se adhieren más fácilmente y son fagocitadas por los mismos (Dahlgren et al.,1981). La locomoción no es prerequisite para la fagocitosis, pero sí se requiere que se forme el pseudopodio tanto en la célula en suspensión como en la célula adherida a una superficie (Smolen y Boxer, 2001).

1.2.6. Mediadores humorales de la respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria es un proceso en colaboración entre macrófagos tisulares, mastocitos, células del endotelio vascular y neutrófilos circulantes (Dinauer, 1998). Se liberan mediadores inflamatorios solubles que activan y coordinan este proceso. Estas moléculas pueden ser generadas a partir de proteínas plasmáticas como el fragmento del complemento C5a o secretado por las células endoteliales o por leucocitos (metabolitos de lípidos, citoquinas) o formados por las bacterias como endotoxinas o péptidos formilados. Las citoquinas proinflamatorias TNF- α y IL-1 estimulan al hígado en la producción de reactantes de fase aguda; promueven la adhesión al endotelio y aumentan la producción de citoquinas quimiotácticas. El IFN- γ es otro mediador proinflamatorio que aumenta la respuesta de fagocitos a los estímulos inflamatorios.

Otras respuestas tempranas son la vasodilatación que se produce por la acción de productos secretados por diferentes tipos celulares: granulocitos (prostaglandina E), basófilos (histamina), macrófagos y mastocitos que secretan PAF que induce degranulación de plaquetas con liberación de histamina y serotonina que aumenta la permeabilidad vascular.

En el sitio de la inflamación se genera una gran variedad de factores quimiotácticos de diferente naturaleza química, producidos por diferentes células en respuesta a productos bacterianos y mediadores inflamatorios liberados por el tejido necrosado. Los neutrófilos van a ser atraídos hacia el lugar de la infección por un gradiente que se genera con diferencias de concentraciones tan pequeñas como del 1% (Smolen y Boxer, 2001).

Las moléculas generadas por activación del complemento (C5a) o por las bacterias (péptidos formilados) y otras secretadas por los neutrófilos activados actúan como una retroalimentación positiva reclutando más neutrófilos y activando las células inflamatorias (Tabla 3).

Tabla 3. Factores quimiotácticos de granulocitos y monocitos en el hombre

Quimioattractantes		Fuente	Reguladores	Células blanco
Lípidos	PAF	N, E, B, M, P Endotelio (metabolismo de fosfatidilcolina)	Ionóferos de calcio	N, E
	LTB ₄	N, M (metabolismo de araquidonato)	Patógenos microbianos, péptidos N-formil	N, M, E
Intercrinas (subfamilia α)	IL-8	M, endotelio, otras células	LPS, IL-1, TNF, IL-3	N, B
	GRO α, β, γ	M, endotelio, otras células	IL-1, TNF	N
	NAP-2	P	Activadores de plaquetas	N
Intercrinas (subfamilia β)	MCP-1 (MCAF)	M, endotelio, otras células	IL-1, TNF, LPS, PDGF	M, B
	RANTES	M	IL-1, TNF, anti- CD3	M, B
Otros	Péptidos N-formil	Bacterias Mitocondria	-	N, M, E, B
	C5a	Activación de complemento	Activación de complemento	N, M, E, B

B: basófilo, E: eosinófilos; GRO: growth related gen; LPS: lipopolisacárido; M: monocito; MCAF: factor quimiotáctico y activador de monocitos; N: neutrófilo; NAP-2: péptido activador de neutrófilo; P: plaquetas; Rantes: regulador por activación, expresado en linfocitos T y posiblemente secretados. (Tomado de Dinauer, 1998).

El fosfolípido PAF liberado por fagocitos activados y células endoteliales degranula plaquetas liberándose potentes quimiotácticos para neutrófilos y eosinófilos. La activación de fagocitos estimula la fosfolipasa A_2 que cliva los fosfolípidos de membrana generando ácido araquidónico que a su vez origina el agente quimiotáctico leucotrieno B_4 . (Dinauer, 1998).

Las citoquinas (IL-8 , TNF- α y IL-1 β) son agentes quimiotácticos potentes y selectivos que participan en el reclutamiento de PMN hacia el sitio de inflamación; la estimulación persistente con IL-8 induce degranulación y producción de agentes oxidantes por parte del PMN. El TNF- α y la IL-1 β son citoquinas proinflamatorias que tienen también efectos sistémicos produciendo cambios termorregulatorios, hemostáticos, hemodinámicos e inmunológicos. *In vivo* en el entorno inflamatorio es frecuente observar cambios en la tensión de oxígeno que alteran la función del PMN así la hipoxia aumenta la adherencia selectiva del PMN a la laminina y aumenta el porcentaje de PMN de sangre entera que participa en la fagocitosis y la expresión de receptor Fc γ . La reoxigenación se asocia también con aumento en la producción de anión superóxido y la adhesión de PMN a células endoteliales en cultivo. Se ha demostrado que la hipoxemia en presencia de estas citoquinas aumenta la fagocitosis, la expresión de receptores y los niveles de mRNA de receptores de Fc y de complemento, mientras que la hipoxemia, seguida de reoxigenación, reduce la fagocitosis y la actividad bactericida en presencia de estas citoquinas porque se reduce la expresión de receptores de opsoninas (Knowles et al., 1997).

Se ha estudiado en neutrófilos de conejo la acción de estas sustancias quimiotácticas (C5a, LTB4, PAF, IL-8 y fMLP) y se ha encontrado que todas inducen una leucopenia rápida y transitoria. Los neutrófilos prácticamente desaparecían de circulación a los 5 minutos, en tanto que los otros tipos celulares eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos disminuían en forma variable probablemente debido a la expresión diferente de los receptores específicos. La respuesta celular frente a PAF, fMLP y LT-8 era específica para los neutrófilos. El PAF y fMLP producen neutrofilia a las 3-4 horas, en tanto que IL8, LTB4 y C5a a la hora aproximadamente. Se observa un aumento del número de neutrófilos en banda lo que sugiere que la leucocitosis es causada por una liberación de neutrófilos de reserva medular, los experimentos que se realizaron con

inhibidores de la síntesis de proteínas como el actinomicina D no suprimieron la leucocitosis frente a quimiotácticos por lo que se piensa que es una respuesta adaptativa que no depende de mediadores secundarios (Jagels y Hugli, 1992).

1.2.7. Moléculas de adhesión

El comportamiento del neutrófilo en la sangre es controlado por dos clases de moléculas de adhesión presentes en la membrana: selectinas e integrinas.

- a) Las selectinas son glicoproteínas de membrana que unen estructuras fucosiladas como Lewis X , sialil-Lewis X y otros carbohidratos específicos. En el neutrófilo encontramos la L-selectina y la E-selectina. Estas selectinas interactúan con ligandos del endotelio y los neutrófilos se adhieren en forma reversible, conservan su forma esférica, ruedan y se intercambian libremente con los neutrófilos circulantes, constituyendo el pool marginal (Nagata et al., 1993).
- b) Las integrinas son proteínas transmembrana que se unen a la matriz externa y a las proteínas de membrana e internamente al citoesqueleto y comunican señales extracelulares (Etzioni y Harlan, 1998). La función de las integrinas es regulada por señales en la cara interna y externa que modulan la afinidad y avidéz de las moléculas. La unión de las integrinas a sus ligandos es regulada por asociaciones con moléculas vecinas. Son heterodímeros compuestos por una subunidad α (PM 150.000 kDa) y una β de 95 kDa. Las principales integrinas del neutrófilo son la LFA-1 $\alpha_1\beta_2$ (CD11a/CD18) y la MAC-1 $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18). Interactúan con la integrina ICAM-1 presente en la célula del endotelio activado (Babior y Golde, 2001; Smollen y Boxer, 2001).

1.2.8. Migración de los neutrófilos al sitio de inflamación

A través de una secuencia de eventos se produce la activación y adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales que permite la migración al foco de inflamación (Fig. 6).

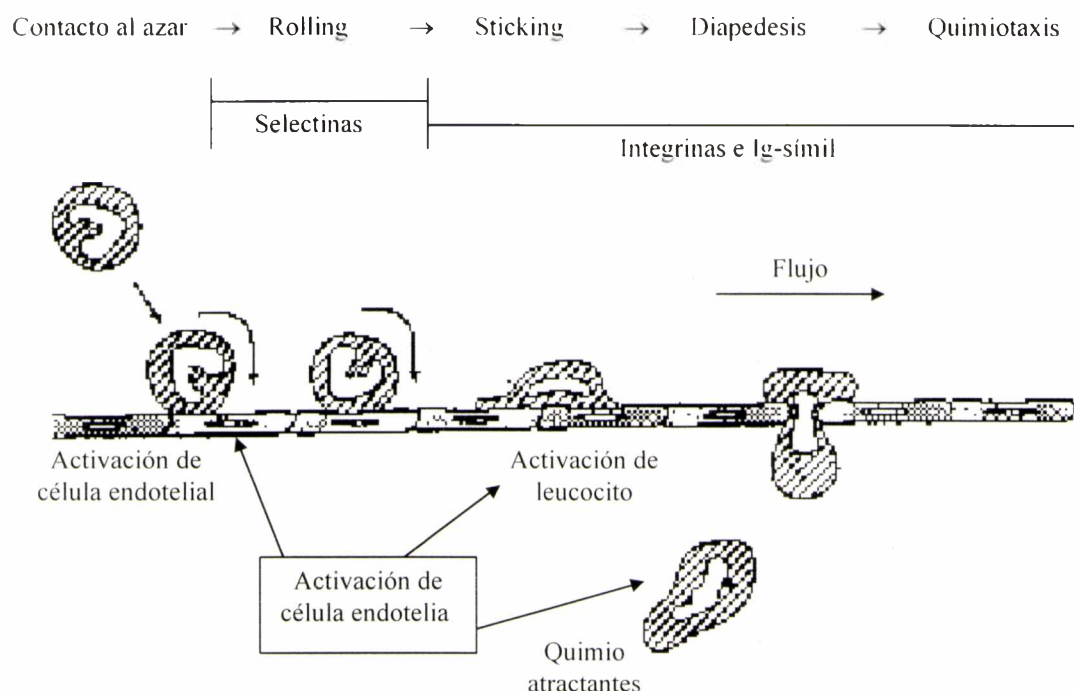


Figura 6. Interacciones del PMN con el endotelio.

Cuando el neutrófilo se expone a mediadores inflamatorios aumentan las L-selectinas sobre la superficie, pero rápidamente sufren un clivaje proteolítico próximo a la membrana, se libera L-selectina soluble que puede inhibir parcialmente la adhesión de leucocitos al endotelio activado *in vitro* (Etzioni y Harlan, 1998).

La exposición de las células endoteliales a citoquinas inflamatorias como lipopolisacáridos, TNF e interleukina 1 producidas por los macrófagos tisulares estimulados por lipopolisacáridos bacterianos, induce la expresión de P y E-selectinas que actúan como receptores de las L-selectinas de los neutrófilos permitiendo que rueden sobre las mismas en una unión débil y reversible (*rolling*).

Además en las células endoteliales activadas aumenta la expresión de ICAM-1 (CD54) que es una molécula de adhesión con cinco dominios tipo Ig- y se expresa en toda la superficie de la célula. El ICAM-1 es el receptor de las integrinas del neutrófilo MAC-1 y LFA-1. Numerosos estímulos (C5a, los N- formil péptidos bacterianos (fMLP), la quimoquina IL8 sintetizada por el endotelio y LTB₄) que actúan sobre el neutrófilo aumentan 10 a 20 veces la expresión de esas integrinas (Babior y Golde, 2001), estableciéndose una unión de alta afinidad entre las células que permite la migración del

neutrófilo a través de la membrana basal y de la matriz extracelular en respuesta a gradientes locales de factores quimiotácticos. Esta migración puede ser bloqueada por anticuerpos contra esas moléculas.

En la transmigración también es importante otro miembro de la superfamilia de las Ig que se localiza principalmente en las uniones intercelulares, el PECAM-1 (CD31) que se activa por fosforilación en respuesta a endotoxinas y PAF e interacciona con moléculas en la superficie del neutrófilo. Dicha unión puede ser inhibida *in vitro* por anticuerpos anti- PECAM-1 (Etzioni y Harlan, 1998).

1.2.9. Funciones de los gránulos y vesículas

El contenido de los gránulos del neutrófilo juega un rol importante en los mecanismos oxidativos y no oxidativos de la inmunidad e inflamación. Todos los gránulos están distribuidos al azar en el citosol de la célula circulante y localizados en el lamelipodio en la célula activada por fMLP (Borregaard y Cowland, 1997).

Los gránulos y vesículas secretoras se movilizan en un orden jerárquico que se relaciona con los diferentes roles que cumplen estas organelas durante el tránsito entre la circulación y el foco infeccioso.

Las vesículas secretoras son las que descargan más rápidamente su contenido, luego lo hacen los gránulos de gelatinasa, los gránulos específicos y por último los gránulos azurófilos. Cuando los neutrófilos humanos son estimulados *in vitro* con concentraciones nanomolares de mediadores inflamatorios, las vesículas secretoras se movilizan totalmente mientras que sólo se vierte 20-25% de gelatinasa y 5% a 7% de lactoferrina (gránulos específicos) y no se libera nada de los gránulos azurófilos. El ionóforo de calcio ionomicina que no utiliza los receptores superficiales aumenta la liberación de todos los gránulos en el mismo orden. Se han realizado también estudios *in vivo* que comprueban ese orden jerárquico (Sengelov et al., 1995).

Las vesículas secretoras son virtualmente movilizadas en forma completa durante la extravasación en respuesta a señales mediadas por selectinas o por mediadores

inflamatorios liberados por el endotelio. Se integran a la membrana plasmática y exponen Mac-1 (CD11b/CD18) que adhiere firmemente los neutrófilos al endotelio, CR1 y receptores de agentes quimiotácticos.

La exocitosis de los gránulos de gelatinasa podría ayudar a degradar el colágeno tipo IV de la membrana basal y tipo V del tejido intersticial aunque no se ha probado que sea esencial para la migración de los neutrófilos a través de la misma (Borregaard y Cowland, 1997).

Los gránulos específicos translocan a la membrana del neutrófilo MAC-1 y el flavocitocromo b_{558} ($gp^{91phox}/p22^{phox}$) componente esencial de la NADPH oxidasa. Además tienen activadores de la cascada del complemento que llevan a la formación del agente quimiotáctico C5a y de la opsonina C3b. Por otra parte liberan lactoferrina que atenúa la granulopoyesis y disminuye la carga negativa de la superficie celular y aumenta la adhesión (Smolen y Boxer, 2001).

Los gránulos azurófilos se caracterizan por el contenido de enzimas hidrolíticas y bactericidas. Tienen lisozima, proteínas catiónicas y defensinas. Estas últimas son las que están en mayor cantidad y las de menor peso molecular (4 kDa), con 29-33 aminoácidos, tienen una estructura cíclica y destruyen la membrana de bacterias además de inducir rupturas en el DNA.

En condiciones normales, las bacterias o partículas extrañas son englobadas por fagocitosis así todos los agentes tóxicos que se liberan en este proceso de activación quedan dentro del fagolisosoma. Pero durante el proceso de adhesión y migración del neutrófilo, esas sustancias pueden agredir al tejido circundante conformando el cuadro que se observa en el proceso inflamatorio.

1.2.10. Resolución de la inflamación

La clarificación de los neutrófilos apoptóticos por los macrófagos juega un rol crucial en la resolución de la inflamación aguda. Los neutrófilos están programados para la apoptosis lo que limita su potencial proinflamatorio y facilita su reconocimiento por los

macrófagos . Hay evidencias que la apoptosis está regulado por varios genes (Fas/Apo-1 y p53, bcl-2). En este sentido se ha estudiado la habilidad de los PMN de sufrir apoptosis espontánea en sangre entera humana en cultivo correlacionada con el aumento de la expresión del receptor de Fas/Apo-1 y la disminución de la expresión de bcl-2 (Majewska et al., 2000).

Hay evidencias de que la ingesta de células apoptóticas por parte del macrófago se produce por mecanismos de reconocimiento específicos que involucran interacciones entre el receptor CD36/vitronectin ($\alpha v\beta 3$) del macrófago con un receptor no conocido del PMN apoptótico vía un puente de trombospondina y receptores específicos de la fosfatidilserina que se transloca de la cara interna a la externa de la membrana plasmática en el neutrófilo apoptótico que así pierde la asimetría de la bicapa lipídica. La muerte de PMN por necrosis provoca daño tisular e inflamación y los restos celulares son fagocitados por los macrófagos activados. En contraste, la fagocitosis de PMN apoptóticos intactos es un proceso de reconocimiento que implica que el neutrófilo no libera sus contenidos tóxicos, el macrófago no secreta factores proinflamatorios y modula la función de los mismos cambiando el perfil de citoquinas que se liberan (TGF- β citoquina no inflamatoria). Se ha demostrado que la ingesta de células apoptóticas reduce la habilidad del macrófago para una segunda ingesta pero la incorporación puede ser modulada por citoquinas apropiadas (Erwig et al., 1999). Se ha descrito en experimentos *in vitro* que el suero de pacientes con granulomatosis de Wegener's que tienen anticuerpo anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) opsoniza los neutrófilos humanos apoptóticos aumentando la fagocitosis por parte de los macrófagos y dispara la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- α y TxB2 lo cual sería un mecanismo importante en la patogénesis de esta enfermedad. Este puede ser un mecanismo importante también en otras enfermedades autoinmunes como ser el lupus eritematosos en donde se producen anticuerpos antifosfolípidos (Moosig et al., 2000).

En experimentos con PMN humanos *in vitro* se ha demostrado , que la adenosina en concentraciones fisiológicas reduce los efectos de TNF α recombinante y del TNF α nativo (liberado por leucocitos mononucleares activados por LPS) sobre los PMN. La adenosina que se libera en el sitio de la inflamación a partir de nucleótidos de purina, se une a receptores A₂ de la membrana del neutrófilo inhibiendo el estallido respiratorio y

la liberación de mieloperoxidasa de los PMN activados con $\text{TNF}\alpha$ minimizando los efectos dañinos sobre el tejido infectado (Barnes et al., 1995).

Por otra parte, se ha demostrado que el óxido nítrico actúa como antiinflamatorio porque inhibe la generación de superóxidos y H_2O_2 por PMN humanos y porcinos estimulados por fMLP y PMA (Timoshenko et al., 1999).

1.2.11. Interacciones ligando–receptor

En el neutrófilo hay una serie de receptores, proteínas de membrana, fosfolípidos y proteinquinasas que en presencia de distintos estímulos pueden inducir la fusión de los gránulos azurófilos y específicos con el fagosoma y la liberación de enzimas proteolíticas además de la activación de los mecanismos bactericidas oxígeno dependientes.

a) Los receptores

Las respuestas de los neutrófilos pueden ser inducidas por una variedad de estímulos particulados o solubles, partículas opsonizadas, inmunocomplejos y factores quimiotácticos producidos durante el proceso inflamatorio que se unen a receptores específicos en la superficie del PMN.

El receptor del agente quimiotáctico N-formilpéptido es el mejor caracterizado. Se han usado como activadores *in vitro* N-formilpéptidos sintéticos análogos a los producidos por bacterias como el N-formil-metionil-leucil-fenilalanina que se une al receptor específico en la superficie del PMN induciendo quimiotaxis, adhesión celular, liberación de radicales libres y degranulación. Se han sintetizado tripéptidos modificados para usarlos como antagonistas con fines terapéuticos evitando así el daño tisular (Derian et al., 1996). El receptor tiene un peso molecular de 50-70 kDa y también se lo encuentra en la membrana de gránulos secundarios, en el PMN activado aumenta su expresión en la membrana plasmática. Ha sido clonado y secuenciado, pertenece a la familia de las proteínas de siete dominios, típico de los receptores que se acoplan a

proteínas que ligan nucleótidos de guanina (proteínas G) y al citoesqueleto (Smolen y Boxer, 2001).

El C5 por activación del sistema del complemento da origen al C5a que es un potente agente quimiotáctico e induce degranulación y producción de superóxidos; se ha encontrado un inhibidor del factor C5a que regularía el proceso inflamatorio. Es un polipéptido de cadena simple de PM 40-48 kDa. ha sido aislado y clonado y se ha observado que la secuencia de aminoácidos es un 20-30% idéntica con la del receptor de fMLP y también pertenece a la familia de proteínas de siete dominios (Smolen y Boxer, 2001).

El neutrófilo en reposo tiene receptores para los agentes quimiotácticos derivados del complemento C3b ó CR1 y C3bi ó CR3; en el PMN activado aumentan porque se movilizan desde el pool intracelular. En experiencias *in vitro* usando concentraciones crecientes de fMLP, se obtuvo el máximo de expresión de ambos receptores a una concentración de 10^{-7} M a los 15 minutos, en tanto que preincubando los PMN con citochalasin B se obtenía ese máximo al minuto de incubación con igual concentración; a los 15 minutos se reducía el pool de CR1, pero no de CR3 concomitantemente con la traslocación de gránulos azurófilos. Por otra parte las proteasas liberadas de los mismos alteran la expresión de receptores funcionales movilizados tempranamente (Lundahl et al., 1995).

El CR3 es de la familia de las β_2 integrinas (CD11b/CD18) y se localiza en los gránulos terciarios y el CR1 es una glicoproteína de PM 205kDa que se encuentra en las vesículas secretoras.

Las integrinas están involucradas en la señalización intra y extracelular que induce cambios conformacionales que regulan la afinidad de los ligandos.

Los PMN en reposo tienen receptores para inmunoglobulinas Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII(CD16), este último unido a la membrana por una unión con glicosilfosfatidil inositol (GPI). Los receptores Fc señalizan a través de una variedad de quinasas como

tirosinquinasa, fosfatidilinositolquinasa y MAPquinasa. Los PMN estimulados con citoquinas expresan FcγRI (CD64) que puede transmitir señales a través de FcγRIIIA.

Hay evidencias de que CD11b participa en las funciones mediadas por FcγR modificando las señales; el anticuerpo anti-CD11b inhibe la fagocitosis de partículas recubiertas con Ig.

El receptor CD66 es una subfamilia (CD66a, CD66b, CD66c y CD66d) de la superfamilia IgG. Se ha descrito últimamente que está comprometido en la adhesión, fagocitosis y activación de la producción de superóxido. Se adhiere a E-selectina de las células endoteliales y la estimulación del CD66 produce un aumento de la adhesión de los neutrófilos al fibrinógeno vía β_2 integrina y a la fibronectina; el CD66c se une al colágeno tipo IV. Nair y Zingde (2001) probaron que es necesario la heterodimerización de CD66a, b y c para promover la adhesión a fibronectina.

El PMN tiene receptores para PAF, IL-8 y LTB₄. PAF y IL-8, pertenecen a la familia de proteínas de siete dominios, los mecanismos de transducción y localización intracelular es semejante a la del receptor de fMLP. El LTB₄ señala también a través de proteína-G.

b) Proteínas G

Los receptores para estímulos quimiotácticos (fMLP, C5a, LTB₄ y PAF) están acoplados con una proteína G_i del sistema de adenilato ciclasa, que une nucleótidos de guanina. La estimulación del PMN a través de estos receptores activa una GTPasa localizada en la membrana plasmática de mismo, pero no con PMA. La toxina de *Bordetella pertussis* inhibe la estimulación del neutrófilo por fMLP, pero no inhibe la degranulación en respuesta a PMA y Ca⁺⁺ en la célula permeabilizada sugiriendo que hay una segunda proteína G que actúa en un sitio distal de la secreción. Los potenciales candidatos son las pequeñas proteínas G de PM 20-30 kDa y algunas pertenecen al sistema de la NADPH oxidasa.

c) Metabolismo de fosfolípidos

El siguiente paso en la traducción de señales es la interacción de las proteínas G activadas y las tirosinquininas con fosfolipasas, en particular con fosfolipasa C que hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) y fosfatidilinositol-4-monofosfato (PIP₁) y produce inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG). (Fig. 7). IP₃ interacciona con un receptor intracelular saturable y estimula la liberación de Ca⁺² (Prentki et al., 1984).

Se ha demostrado que el calcio citosólico en el PMN en reposo se mantiene en niveles de 0,1-1,0 μM. Por una bomba Ca⁺²-ATPasa en membrana se eleva transitoriamente (1-5 μM) en el neutrófilo humano en respuesta a la activación con estímulos vía receptor como fMLP (1 μM) y partículas de zimosan opsonizadas (0,5 mg/ml) o con estímulos como el ionóforo de calcio A23187 (1 μM); el nivel de calcio citosólico aumenta rápidamente coincidentemente con una rápida salida del mismo que termina en 30 segundos y luego opera la entrada de calcio del exterior por 30-60 seg en el caso del fMLP y zimosan, en el caso del ionóforo de calcio esto opera inmediatamente de la adición del activador; no se detectó aumento del calcio citosólico cuando se activó con PMA (25 ng/ml) (Mahomed et al., 2000). El calcio actúa como segundo mensajero en la activación vía receptor de las funciones proinflamatorias del neutrófilo como son adhesión al endotelio vascular, quimiotaxis, fagocitosis, producción de superóxido y degranulación. El aumento de Ca⁺² citosólico activa la gelsolina que acorta los filamentos de actina disminuyendo la viscosidad del ectoplasma permitiendo el acceso de los gránulos a la parte interna de la membrana facilitando la degranulación que es un proceso rápido y eficiente. Los gránulos específicos requieren concentraciones menores de calcio para secretar su contenido, que los gránulos azurófilos.

Se han descrito otras vías de activación de PMN como la producción de ácido fosfatídico (PA) a partir de fosfatidilcolina (PC) por acción de la fosfolipasa D (PLD). Hay evidencias de que PA es crítico en la degranulación (English et al., 1996).

En el neutrófilo estimulado, la PLD activa la fosfolipasa A₂ (PLA₂) presente en gránulos y membrana plasmática y en el citosol del PMN. Produce ácido araquidónico que es un

estimulador del PMN y por ejemplo, activa la bomba de H⁺ asociada con NADPH oxidasa. Los derivados de la acción deciclooxigenasa y lipoxigenasa (Fig. 4) tienen diferentes acciones en la quimiotaxis, agregación y adhesión de PMN.

d) Proteinquinasas

El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) activa el PMN a través de una proteinquinasa (proteinquinasa C o PKC) Ca⁺² sensible, la enzima une fosfatidilserina y se localiza en el citoplasma del PMN en reposo y se redistribuye en la membrana plasmática luego de la activación con PMA. Asimismo, el DAG derivado de la hidrólisis de fosfolípidos también actúa como activador. Los inhibidores de PKC no bloquean la activación del PMN frente a estimuladores fisiológicos (Wright y Hoffman, 1986; Combadiere et al., 1990). Esta vía no parece tener un rol importante en la degranulación. Hay otras quinasas que pueden estar involucradas en la activación. Las proteinquinasas asociadas a microtúbulos (MAPK) y las múltiples quinasas de esta cascada han sido vinculadas con la adhesión a través de L-selectinas (Waldell et al., 1995). En los PMN estimulados se fosforila la PLA₂ y esta enzima está regulada vía p42/p44 MAPK. La adhesión a través de integrinas involucra *src* y *syk* quinasas y la fosforilación de tirosinas (Fuortes et al., 1994; Lowell et al., 1996; Fernández y Souchard, 1998).

Se ha demostrado que los lipoarabinomananos (LAM) obtenidos de *Mycobacterium bovis* compuestos por homopolisacáridos del tipo D-mananos altamente ramificados forman un ancla fosfatidil-mio-inositol y manooligosacáridos al interactuar con proteínas de la membrana de PMN que tienen dominios ricos en glicosilfosfatidil inositol y que contienen quinasas de la familia de tirosinquinasa Src activando transitoriamente Hck, la desacilación de LAM inhibió el efecto sobre la activación de Hck. No está claro como se produce la activación de Hck. ManLAM estimula la expresión y secreción de TNF α en PMN. La quimiotaxis está también bajo control de la familia de tirosinquinasa Src; en ratones knockout Hck^{-/-} la movilización es deficiente (Astarie-Dequeker et al., 2000).

Además el Ca puede regular las interacciones de anexinas. Las anexinas son proteínas Ca^{+2} -dependientes que unen fosfolípidos y han sido detectadas varias en PMN; estas anexinas unen membranas de PMN y gránulos.

El DAG afecta la fusión; además la fusión puede ser modulada por la distribución asimétrica de los fosfolípidos.

1.2.12. Actividad microbicida

a) Mecanismos no oxidativos

El armamento bactericida es amplio y relativamente eficiente aun en ausencia del estallido respiratorio como se observa en condiciones de anaerobiosis o en células de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica. Luego de la fagocitosis, la fusión con los gránulos azurófilos ácidos y la activación de bomba de iones disminuye el pH en el fagosoma lo que aumenta la actividad de las proteínas catiónicas.

Las principales proteínas que participan en la acción contra las bacterias se describen a continuación.

La lisozima que hidroliza los proteoglicanos de la pared de ciertas bacterias y la lactoferrina secuestra el hierro necesario para el crecimiento bacteriano son parte de ese arsenal no oxidativo (Ellison y Giehl, 1991).

Las defensinas son proteínas catiónicas de bajo PM, tienen 29-33 aminoácidos y tienen estructura cíclica; constituyen el 5-8 % del total de proteínas de la célula. Tienen una potente actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y virus; su actividad se inhibe en un medio que contiene concentraciones fisiológicas de ClNa y cationes divalentes (Ca^{++} y Mg^{++}) sugiriendo que ejercen su actividad en el fagosoma; se liberan al medio extracelular y aumentan la interacción neutrófilo-neutrófilo. Yomogida et al. (1996) demostraron que las defensinas de chanchitos de la India inhiben la producción de superóxidos y la ingestión de partículas de zimosan opsonizadas con complemento, pero

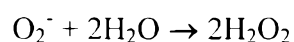
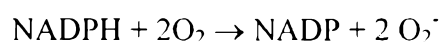
no la unión en PMN humanos. No observaron inhibición en la generación de superóxido en la fagocitosis IgG-dependiente o la estimulación con fMLP y PMA. O sea que las defensas actuarían modulando la función del PMN en los sitios de infección o inflamación.

Las proteínas catiónicas de la familia de las CAP37 se encuentran en los gránulos azurófilos, tienen actividad microbicida al pH ácido del fagolisosoma y además tienen acción quimiotáctica sobre monocitos, que parece ser un rol más importante (Polh et al., 1990).

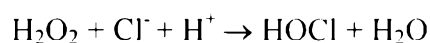
La proteína que aumenta la permeabilidad de bacterias (BPI) es una proteína catiónica que lisa bacterias gram negativas y pertenece a una familia que incluye las proteínas que ligan LPS. El BPI se une a LPS que es un mediador inflamatorio potente y lo inhibe (Marra et al., 1992).

b) Metabolismo oxidativo

La activación de los PMN inicia el estallido respiratorio que conduce a la reducción parcial del oxígeno a O_2^- a expensas de NADPH.



El agua oxigenada es transformada en ácido hipocloroso por acción de mieloperoxidasa:



El ácido hipocloroso (HOCl) que se forma es un potente agente oxidante que inactiva el inhibidor de α_1 -proteasas y activa colagenasa y gelatinasa.

La enzima responsable de la producción de superóxido es una oxidasa que se activa cuando los PMN son estimulados por bacterias opsonizadas o agentes quimiotácticos.

La actividad de esta enzima está disminuida o ausente en la enfermedad granulomatosa crónica (CGD) (Curnutte et al., 1989; Babior, 1991; Thrasher et al., 1994) que es una enfermedad hereditaria caracterizada por la incapacidad de los PMN de expresar el estallido respiratorio. En CDG, los PMN no generan anión superóxido y no pueden matar las bacterias catalasa positivas o sea aquellas que destruyen el H_2O_2 producida por las mismas como por *Staphylococcus aureus*. En tanto que las bacterias catalasa negativas (pneumococo o estreptococos) mueren por acción del H_2O_2 que producen y la mieloperoxidasa que se vuelca en el fagosoma por la degranulación.

Se ha estudiado la activación de la oxidasa en homogenatos acelulares de PMN en reposo observándose que están involucradas fracciones solubles y no solubles ligadas a membranas (Curnutte et al., 1987).

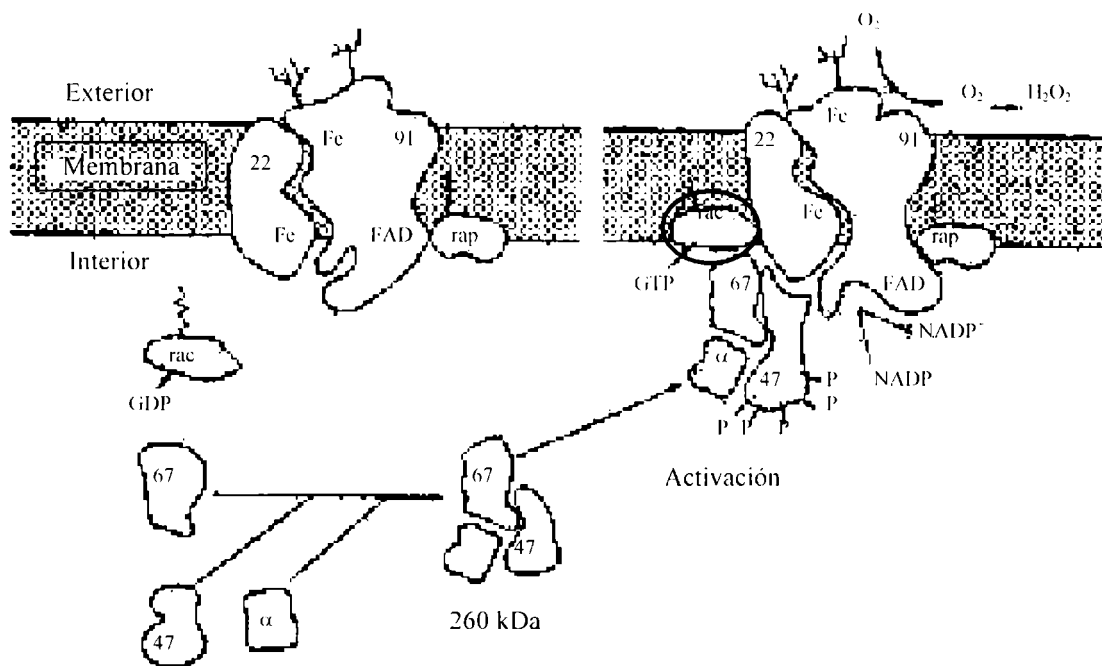


Figura 8. Modelo hipotético de activación de la NADPH-oxidasa en PMN (adaptado de Curnutte et al., 1994).

La oxidasa está compuesta por: a) proteínas citosólicas "p47-phox" (*phox* significa phagocyte oxidase) de 47-kDa, "p67-phox" de 67kDa; dos proteínas G citosólicas de bajo peso molecular *rac* 1/2 (*rac* 2 en PMN humanos) y *rap1A* y una proteína de 40 kDa o "p40-phox" y b) un sistema de transporte de electrones que consiste en una flavoproteína que liga flavin-adenin-dinucleótido (FAD) y el citocromo b_{558} (Fig. 8).

En experimentos con citocromo b_{558} solubilizado con detergentes, se demostró que es un heterodímero constituido por dos subunidades: una proteína 22 kDa y una glicoproteína 91 kDa (Parkos et al., 1988). El citocromo b humano contiene al menos 2 grupos hemo, uno en la subunidad 91 kDa y uno entre las dos subunidades y probablemente las regiones que los contienen se asientan en la bicapa lipídica en donde los electrones son transferidos de la flavoproteína al hemo y luego al oxígeno localizado en algún lugar cerca de la región extracelular de la membrana (Quinn et al., 1992). La subunidad 91 kDa une FAD en la región media de la molécula, el NADPH en la región carboxilo terminal y en la región N terminal se unen el hemo y la proteína p22 kDa (Sumimoto et al., 1992). El citocromo b_{558} se distribuye entre la membrana plasmática y los gránulos específicos y vesículas secretoras en PMN en reposo; en el PMN estimulado el citocromo b_{558} de los gránulos se trasloca a la membrana plasmática.

La activación del sistema NADPH-oxidasa se asocia con la traslocación de los componentes citosólicos p47-kDa y 67-kDa al citocromo b_{558} de membrana plasmática (Clark et al., 1990) y se produce superóxido luego de un intervalo de varios segundos después de la estimulación.

En los PMN humanos los componentes citosólicos se traslocan a la membrana plasmática en forma secuencial, primero se ensambla la p47-*phox* y la p67-*phox* y luego se asocian las *rac1* y *rac2* activadas. Hay otras proteínas accesorias como la p40-*phox* que se asocia con p47-*phox* y p67-*phox* a través de motivos SH3 y PC. Las proteinquinasas están involucradas en la fosforilación de p47-*phox* (PKC, PKA, MAPquinasas, ERK y otras); la p47-*phox* tiene varios sitios de fosforilación en serinas. La p67-*phox* también se fosforila durante la activación de los PMN. La fosforilación de *rap1A* inhibe la actividad. La unión con las proteínas altera la estructura terciaria del citocromo b y se activa la cadena de transporte de electrones del NADPH a través del grupo prostético flavina (FAD).

La p67-*phox* facilita el flujo del electrón de NADPH a FAD y la p47-*phox* permite transferir el electrón de la flavina al citocromo b_{558} y luego al oxígeno. Se sabe que la p47-*phox* se une al carboxilo terminal de ambas subunidades del citocromo b_{558} ; estas interacciones parecen ser importantes en la regulación del flujo de electrones en el hemo

(Cross y Curnutte, 1995) (Fig. 9). Los pacientes con déficit de *p47-phox* producen pequeñas cantidades de H_2O_2 y otros agentes oxidantes por autooxidación de la flavina reducida suficiente para mejorar la capacidad microbicida comparado con los PMN de pacientes con déficit de citocromo b_{558} en donde no se produce superóxido.

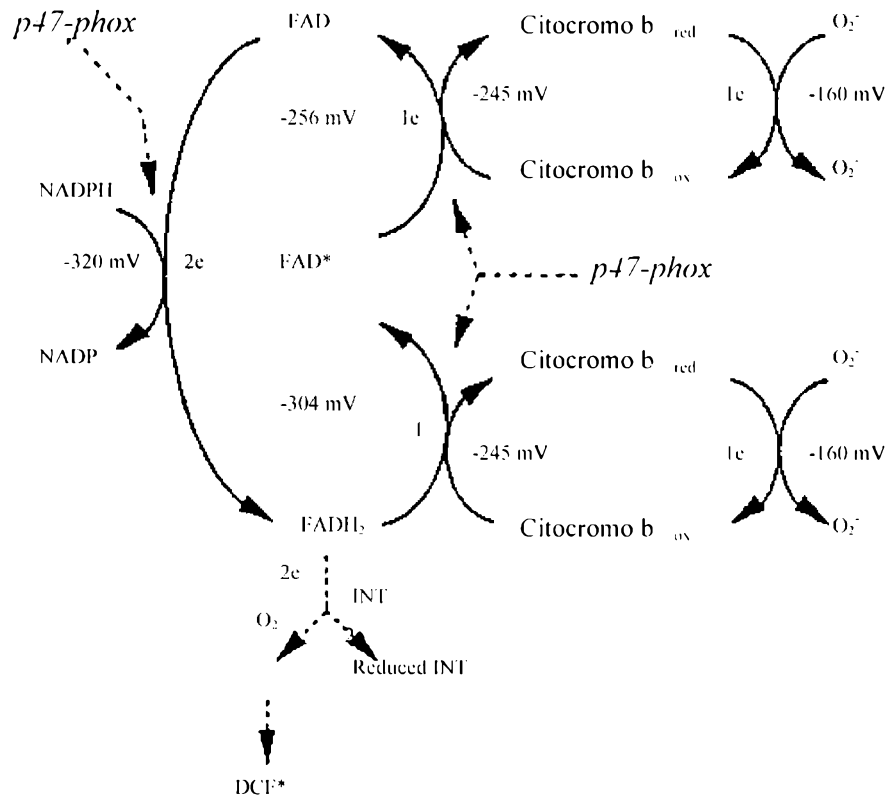


Figura 9. Modelo de flujo de electrones en la NADPH-oxidasa. DCF: diclorofluoresceína, INT violeta de iodonitrotetrazolium.

El proceso de activación de la NADPH-oxidasa no parece ser tan sencillo. Kobayashi et al (1998) identificaron sitios intracelulares (gránulos específicos y vesículas secretoras) de producción de superóxidos en PMN humanos estimulados con PMA. Estos compartimientos productores de superóxido se fusionan con la membrana plasmática o con otras estructuras intracelulares productoras de superóxidos y luego con la membrana plasmática, es decir que se liberan superóxidos por exocitosis de gránulos intracelulares. En la fagocitosis con PMN humanos, la mayor parte de la producción de metabolitos del oxígeno ocurre en el fagolisosoma mientras que la superficie libre de la membrana plasmática no produce superóxido; se ha sugerido que la NADPH-oxidasa se

transfiere de los gránulos específicos al fagosoma, se degranula y produce superóxidos. El NADPH es regenerado vía hexosa monofosfato.

Ohashi et al. (1995) comprobaron que un inhibidor de proteasas sintético (gabexato) suprime la translocación de p47- y p67-*phox* en PMN humanos intactos estimulados con PMA y en el sistema acelular activado con ácido araquidónico y que el inhibidor se une a través de un grupo catiónico del gabexato mesilato a residuos de serina del componente de membrana o a la proteína p47-*phox* impidiendo la unión a la proteína de membrana de modo de inhibir así el estallido respiratorio. Así este inhibidor de proteasas que inhibe proteólisis y también funciones del PMN podría ser útil en la prevención de la injuria tisular mediada por neutrófilos.

2. Hipótesis, objetivos y diseño experimental

2.1 Hipótesis

- Se encuentra(n) una(s) galectina(s) presente(s) en bazo y en polimorfonucleares porcinos.
- Sus características bioquímicas y su estructura primaria se corresponden con las de galectina-1.
- La galectina-1 de bazo porcino tiene efectos sobre la activación de NADPH-oxidasa, la degranulación y la fagocitosis en polimorfonucleares homólogos.
- En la superficie de los neutrófilos porcinos y humanos hay receptores/ligandos para la galectina esplénica porcina.

2.2. Objetivos

En humanos se han caracterizado galectinas de varios tejidos (placenta, pulmón, bazo, hígado, macrófagos). En porcinos se ha descrito galectina-2 y -3 en intestino delgado y galectina-4 en mucosa oral; nos proponemos buscar galectina en PMN y bazo porcino.

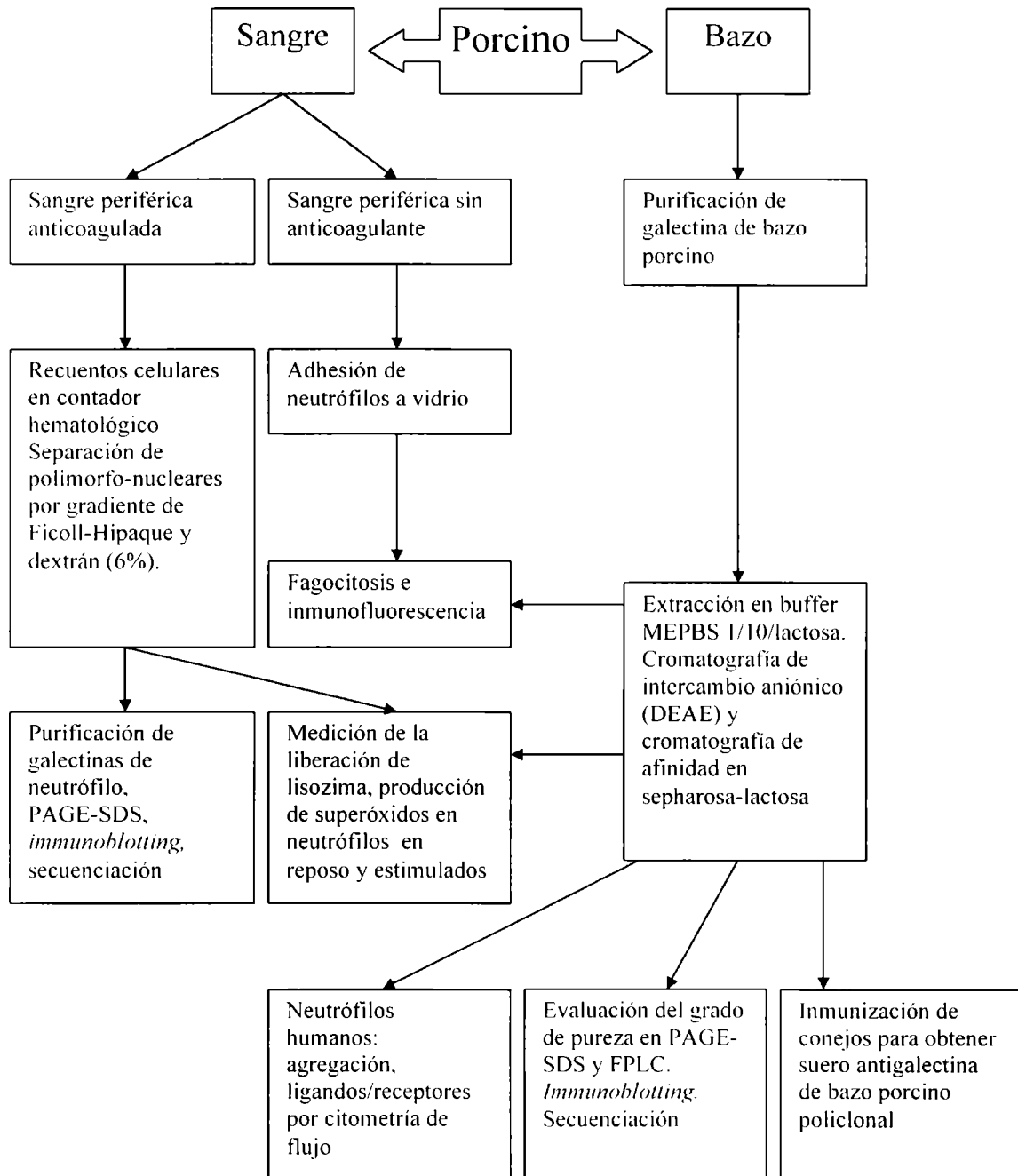
Hay evidencias de que las galectinas están involucradas en la activación de las células inflamatorias, por lo tanto es importante estudiar cómo se modula la respuesta de dichas células. Las células fagocíticas protegen a los organismos superiores contra las infecciones. Los neutrófilos, junto con los monocitos presentes en sangre y los

macrófagos titulares, son los fagocitos profesionales en defensa contra los microbios. Por lo tanto nos propusimos estudiar el efecto de galectina-1 sobre la actividad de los neutrófilos.

Los objetivos generales fueron:

- Purificar lectinas con especificidad β -D-galactosídica a partir de bazo y polimorfonucleares de cerdo.
- Caracterizar sus propiedades bioquímicas y estructura primaria; comparar las secuencias de aminoácidos con otras conocidas para determinar a qué tipo pertenecen.
- Estudiar la posible acción de la galectina de bazo porcino en el estallido respiratorio, la degranulación y la fagocitosis de neutrófilos de sangre periférica de cerdo.
- Detectar la presencia de ligandos/receptores para dicha galectina en polimorfonucleares homólogos y heterólogos.

2.3. Diseño experimental



3. Material y métodos

3.1 Obtención de galectinas de bazo y neutrófilos porcinos

3.1.1 Animales y muestras utilizadas

Se obtuvieron al momento del sacrificio muestras de sangre y bazos enteros a partir de hembras adultas y lechones de 6 meses de edad, de aproximadamente 10 kg de peso, de la raza *Sus scrofa*, ingresados a frigoríficos locales.

3.1.2 Obtención de homogenatos de bazo

Se procesaron bazos porcinos de acuerdo a lo descrito por Elola y Fink (1997). Los órganos se conservaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados. La homogenización del tejido se efectuó en buffer MEPBS (75 mM ClNa, 75 mM PO₄HNa₂/PO₄H₂K, 4 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM EDTA, pH 7,2) 1:10, conteniendo lactosa 300 mM (1,6 g de tejido/ml de buffer). Los extractos solubles se obtuvieron por centrifugación a 900 xg durante 60 min, a 4°C, se filtró por gasa y se centrifugó nuevamente a 1800 x g.

Se recuperaron los sobrenadantes para efectuar la purificación de la lectina. Una pequeña alícuota de cada uno de éstos se dializó contra el mismo medio de extracción sin el azúcar, a los efectos de cuantificar la actividad hemoaglutinante frente a eritrocitos de conejo tratados con neuraminidasa y fijados con glutaraldehído (véase 3.2.2.a).

3.1.3 Aislamiento de neutrófilos

La sangre porcina fue colectada en tubos de plástico con heparina (10 μ l/ml) de sangre. Luego se purificaron los neutrófilos siguiendo la técnica descrita en Boyum (1968). Las muestras se diluyeron 1:2 en solución fisiológica y se colocaron lentamente en tubos plásticos que contenían Ficol-Hypaque (F-H); en una relación de 3 volúmenes F-H:5 volúmenes de sangre diluida. Se centrifugó a 450 x g durante 45 min. Se separaron diferentes capas según lo indicado en la Fig. 10.

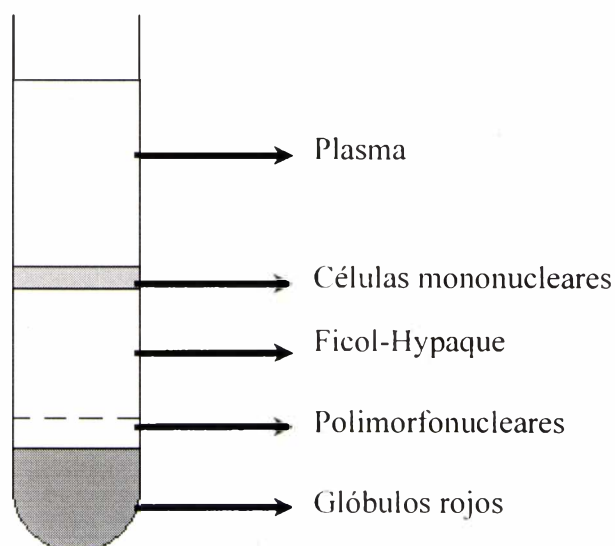


Figura 10: Fraccionamiento celular de sangre entera por centrifugación en F-H.

Se recuperó la nube de neutrófilos (PMN) que se encuentra entre el F-H y los glóbulos rojos y se realizó una sedimentación en dextrán al 6% en cloruro de sodio 0,9% agregando 3ml de dextrán 6% y 3 ml de PBS en los mismos tubos; se mezcló suavemente con pipeta dejando luego en reposo durante 60 min a 4°C.

Se separó el sobrenadante rico en células polimorfonucleares y se sometió a un breve shock hipotónico con 1 ml de agua destilada durante 45 segundos para lisar los eritrocitos. se agregaron inmediatamente 12 ml de solución salina balanceada de Hanks- $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$.

La suspensión de neutrófilos obtenida se cuantificó en un contador hematológico Coulter JT (Beckman-Coulter Corp., Fullerton CA, Estados Unidos).

También se determinó la pureza de la preparación de neutrófilos en extendidos fijados con metanol 1 minuto y posterior coloración con Giemsa 1:10 durante 2-3 minutos. Se observaron al microscopio óptico y se recontaron 100 células para obtener el porcentaje.

3.1.4 Purificación de la galectina de bazo

a) Cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones citosólicas que se obtuvieron después de centrifugar, se sometieron a cromatografía de intercambio iónico utilizando DEAE-Sepharosa CL-6B como intercambiador aniónico, equilibrado previamente en MEPBS 1:10. Se dejó una noche en agitación; luego se lavó con MEPBS 1:10 para eliminar los materiales no unidos y se eluyó con MEPBS 1:10, conteniendo ClNa 500 mM. Las fracciones eluidas de la resina de intercambio aniónico entraron luego en cromatografía de afinidad (Ahmed et al., 1994).

b) Cromatografía de afinidad

Los eluatos de DEAE-Sepharosa se sembraron en columnas de 50 ml de lactosa-agarosa, equilibradas con MEPBS 1:10-ClNa 500 mM. Una vez lavado el material no unido específicamente, primero con 6 veces el volumen de Sepharosa (aproximadamente 300 ml) de MEPBS 1:10-ClNa 500 mM y luego con 300 ml de MEPBS 1:10; la proteína ligada se eluyó con lactosa 100 mM en MEPBS. El contenido proteico de cada fracción eluida se midió por el método de Bradford descrito en 3.1.4.c.

c) Determinación del contenido proteico por el método de Bradford

La concentración proteica de algunos extractos crudos y de las lectinas purificadas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Los ensayos se realizaron incubando la muestra o la proteína estándar según las relaciones volumétricas y condiciones experimentales que se detallan en Tabla 4, para cinco diluciones de la albúmina y de la muestra de concentración desconocida:

La absorbancia en cada tubo se leyó a 595 nm y las concentraciones desconocidas se calcularon utilizando la pendiente de la curva estándar según la siguiente relación:

$$\text{Concentración incógnita} = \frac{\text{Absorbancia de muestra}}{\text{Factor}}$$

Tabla 4. Protocolo para la determinación del contenido proteico

	Curva estándar					Muestra
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	
Albúmina (μ l)*	0	10	20	30	40	0
	(blanco)					
MEPBS-lactosa (100 mM) (μ l)	800	790	780	770	760	400
Extracto (μ l)	0	0	0	0	0	400
Reactivo de Bradford (μ l)	200	200	200	200	200	200

*La concentración de la solución estándar de albúmina empleada en este ensayo fue de 0,98 mg/ml.
Incubación : 15 minutos a t.a.

d) Almacenamiento de la galectina-1 purificada en columnas de DEAE

Se procedió a la siembra en columnas de DEAE preparadas en jeringa de plástico de 5 ml, sobre un piso de lana de vidrio se colocó 1ml de DEAE. Se equilibró la columna con MEPBS 1/10 y luego se sembró el eluido de la columna de afinidad lentamente sobre la pequeña columna y se cubrió con una solución al 50% de glicerol en MEPBS 1/10 se dejó pasar una pequeña cantidad del líquido y luego se cerró la columna y se la conservó a -20°C .

Para eluir la proteína de la minicolumna se lavó la misma con MEPBS 1/10 para eliminar la lactosa y se eluyó con pequeñas cantidades de MEPBS-ClNa 500 mM y luego se midió la cantidad de proteína con la técnica de Bradford en microplacas en un lector Molecular Devices Inc. (Sunnyvale CA, Estados Unidos), a 595nm.

3.1.5 Purificación de la galectina obtenida de neutrófilos

Se obtuvo una suspensión celular preparada según la técnica detallada en el ítem 3.1.3, a partir de 5 litros de sangre anticoagulada con heparina; se centrifugó a 100 x g durante 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en buffer hipotónico de lisis (MEPBS 1:10, conteniendo Triton X-100 1% y PMSF 25 mM). Las suspensiones se congelaron a -20°C hasta el momento en que se efectuaron las purificaciones.

La suspensión se sometió a dos ciclos de congelado-descongelado y la fracción citosólica de la misma se obtuvo por centrifugación a 100.000 x g durante 60 minutos.

Las fracciones citosólicas fueron sometidas a cromatografía de afinidad en una columna de 5 ml de lactosa agarosa, previamente equilibrada con MEPBS 1/10-CINa 500mM.

Luego se eluyó la proteína de la columna de afinidad con MEPBS-lactosa 100mM.

Posteriormente se determinó el contenido proteico por la técnica de Bradford (ítem 3.1.4.c), se liofilizó la muestra y conservó a -20°C para su posterior utilización.

3.2. Caracterización bioquímica parcial de la galectina de bazo porcino

3.2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se efectuó la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes, o sea en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1%, según el método de Laemmli (Laemmli, 1970) a los efectos de evaluar el grado de pureza de las muestras obtenidas y el peso molecular de la subunidad proteica de las galectinas en estudio.

Se utilizaron geles de un porcentaje de acrilamida de 12% y un espesor de 0,75 mm. Las muestras se desnaturizaron por calentamiento a 100°C en buffer de muestra con SDS 2% y mercaptoetanol durante 90 segundos. Se sembraron de 5 a 15 µl de la muestra en cada calle. La muestra se obtuvo del DEAE conservado a -20°C; primero se lavó el mismo con 10 ml MEPBS 1/10 y luego se eluyó con 200 µl de MEPBS -ClNa 500 mM.

Los estándares de PM utilizados fueron los siguientes:

- Dalton Mark VII-L (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, Estados Unidos): BSA (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor del tripsinógeno (20,1 kDa) y lactoalbúmina (14,2 kDa).

- Estándares preteñidos: (Bio Rad, Richmond, Estados Unidos) fosforilasa B (103kDa), albúmina bovina (76kDa) , ovoalbúmina (49kDa), anhidrasa carbónica (33,2kDa), inhibidor de tripsina (28,0 kDa) y lisozima (19,9 kDa).

Las corridas se efectuaron a 1 mA por muestra (10 mA/gel con diez siembras), mientras las proteínas atravesaban la zona del gel de empaquetamiento (*stacking*); cuando las muestras pasaron al gel de resolución, la intensidad de la corriente se incrementó al doble. Se trabajó a 10°C, usando azul de bromofenol para visualizar el frente de corrida. Los geles se tiñeron a t.a. con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,125% en una solución de metanol 50% y ácido acético 10%, siendo desteñidos en metanol 2%-ácido acético 7%.

Los PM aparentes de las lectinas puras se interpolaron de los gráficos de movilidad versus logaritmos de PM de los estándares corridos en el mismo gel, límite de ± 0.5 kDa.

3.2.2 Determinación de la actividad lectínica hemoaglutinante

a) Preparación de suspensiones globulares desializadas

Se obtuvieron GRC tratados con neuraminidasa (sialidasa) y fijados con glutaraldehído (GRCD) (Joubert et al., 1986). Para ello, los GRC se lavaron tres veces en SF y se desializaron con neuraminidasa Sigma de *Clostridium perfringens* (0,06 UI/ml de pellet globular), durante 90 min a 37°C, en agitación periódica. Luego, los eritrocitos fueron lavados tres veces en buffer fosfato-salina (PBS: $\text{P}_0_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ 150 mM-CINa 150

mM, pH 7.2) y se fijaron en glutaraldehído fresco al 1% durante 1 h, a temperatura ambiente (t.a.) y en agitación periódica. La fijación se terminó mediante cuatro lavados en glicina 0,1 M en PBS, efectuando luego cuatro lavados en PBS. Los GRCD se conservaron a 4°C como suspensiones al 1% (v/v) en ClNa 150 mM conteniendo azida sódica 1‰, hasta tanto no se obtuviesen reacciones falso positivas.

b) Determinación cuantitativa de la actividad hemoaglutinante

La cuantificación de la actividad hemoaglutinante de la lectina pura y en muestras crudas utilizadas para purificar, se llevó a cabo en microplacas en U, utilizando GRCD preparados como se indicó en la sección 3.2.2.a. Cada pocillo de la placa fue sembrado con 50 µl de cada dilución de los extractos preparada en ClNa 150 mM, 50 µl de ClNa 150 mM, 50 µl de albúmina sérica bovina al 1% en ClNa 150 mM y, finalmente, 50 µl de la suspensión de GRCD al 1%. Se incubó 3 h a t.a. Se efectuaron controles de GRCD incubados en ausencia de muestra. La lectura se hizo macroscópica de acuerdo a un score establecido.

La mayor dilución de una muestra que presentó hemoaglutinación positiva se consideró que poseía una *unidad hemoaglutinante* (1 UH). El *título* (T) de cada extracto se expresó como la inversa de la dilución que resultó ser el punto final y la actividad hemoaglutinante fue tomada como el $\log_2(T+1)$, para posibilitar el análisis estadístico con pruebas paramétricas. La *actividad específica* se definió como el número de UH/mg de proteína soluble o como $\log_2(T+1)/\text{mg/ml}$ de proteína soluble.

3.2.3 Inhibición de la actividad lectínica hemoaglutinante por azúcares específicos con glóbulos rojos de conejo desializados

Los estudios cualitativos y cuantitativos de inhibición total de las actividades de la lectina de bazo porcino puro se efectuaron en microplacas en U, utilizando GRCD preparados como se indicó en la sección 3.2.2.a.

Cada pocillo de la placa fue sembrado con 20 μ l de una dilución de lectina tal que contuviese 2-4 UH preparada en ClNa 150 mM, 20 μ l de cada azúcar, ya sea en concentración 150 mM para pruebas cualitativas o diluciones seriadas del mismo a partir de dicha concentración para ensayos cuantitativos. Después de incubar 30 min a t.a., se agregaron 20 μ l de albúmina al 1% en ClNa 150 mM y, finalmente, 20 μ l de la suspensión de GRCD al 1%. Se incubó 3 h a t.a.

En los ensayos de inhibición al 50%, 20 μ l de diluciones seriadas al medio de la lectina fueron empleados en vez de 2-4 UH de la misma.

Se efectuaron los ensayos de inhibición de la hemoaglutinación con lactosa, tiodigalactósido, N-acetil-lactosamina, D(+) galactosa, D(+) glucosa, sorbitol, sacarosa, maltosa, fructosa, ribosa, manitol, D(+) manosa, N-acetil-glucosamina, D(+) celobiosa, p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, p-nitrofenil-N-acetil- β -D glucosaminida, 1-O-metil- β -D-galactopiranosido, 1-O-metil- α -D-galactopiranosido, α -D(+) melibiosa (G-O- α -D galactopiranosil-D-glucosa), D(+) rafinosa (α -D-galactopiranosil-6- α -D-glucopiranosil- β -D-fructopiranosil), ácido lactobiónico (4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucónico), ácido

poligalacturónico, N-acetilneuramínico, lactulosa (β -galactopiranosil-D-fructofuranosa), p-nitrofenil- β -D-lactopiranosido, D(+) galactosamina y N-acetil-D galactosamina.

3.2.4 Obtención de anticuerpos policlonales antigalectina esplénica porcina

Se preparó un suero antigalectina de bazo porcino en conejos New Zealand, previa obtención de las muestras de suero preinmune, de acuerdo a lo descrito previamente para otra galectina (Elola et al., 1997) . El antígeno se preparó emulsionando 300 μ l de la lectina pura (conteniendo 100 μ g de proteína) en un volumen igual de adyuvante completo de Freund y se inyectó por vía subcutánea. A la semana siguiente, igual cantidad de antígeno que la utilizada en la primera inyección se emulsionó en adyuvante incompleto de Freund y se inyectó por vía intramuscular. Se repitieron un total de alrededor de 20 inyecciones intramusculares más, de 100 μ g de lectina cada una y a intervalos de 7 días. Asimismo, se efectuaron sangrados periódicos, a los efectos de evaluar el antisuero por el método del *immunoblotting* o *dotting*.

La especificidad del antisuero antigalectina de bazo porcino se estudió en *immunoblotting* siguiendo el método descrito por Elola y Fink (1997). Asimismo, se evaluaron posibles reactividades cruzadas con otros antisueros policlonales y monoclonales antigalectina-1 (cerebro y bazo humanos).

Primeramente, se efectuó la transferencia electroforética de los geles de PAGE-SDS en los que se corrió la galectina de bazo porcino. Estos geles se sometieron al *Western blot* en membranas de nitrocelulosa a 0,4 A en Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8,3 (buffer Towbin), durante 1 h.

Las membranas se bloquearon en leche 5%-PBS-Tween 20 0,05% durante 1 h a t.a. y en agitación. Se incubó con el primer anticuerpo antigalectina de bazo porcino diluido 1/100 en PBS Tween 20 durante 1 h a t.a. Se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS-Tween 20 0,05% (con azida) y se incubó con el suero anti-IgG de conejo obtenido en oveja conjugada con peroxidasa (segundo anticuerpo, Sigma) en una dilución 1:1000 en PBS-Tween 20 0,05% (con azida), durante 1 h a t.a. Finalmente, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS y se desarrolló con 4-cloro-1-naftol disuelto en metanol y con H₂O₂ 30% en buffer Tris-salina (Tris 20 mM, ClNa 500 mM, pH 7,5) durante 2-10 min, las membranas se lavaron varias veces con agua destilada para detener la reacción y se secaron al aire.

3.2.5 Cromatografía de exclusión molecular

Se realizó en colaboración con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel). Se utilizó una columna de Superosa 12 HR 10/30 adaptada a un sistema de FPLC (Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia). La columna se equilibró con buffer PBS conteniendo lactosa 3 mM y se eluyó a un flujo de 0,5 ml/min con el mismo buffer, registrándose la absorbancia del eluato a 280 nm y la actividad hemoaglutinante. El volumen de muestra inyectado fue de 100 µl. Se utilizaron los siguientes marcadores de pesos moleculares para calibrar la columna: β-amilasa de batata (200 kDa), alcohol deshidrogenasa de levadura (150 kDa), seroalbúmina bovina (66kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (29 kDa) y citocromo c equino (12.4 kDa). El volumen muerto y el volumen total accesible al solvente de la columna se determinaron empleando azul Dextrano y azida sódica, respectivamente.

3.2.6 Digestión enzimática

Se efectuó la digestión triptica de la galectina-1 esplénica porcina disolviendo la misma en NH_4HCO_3 0,4 M (pH 7,8) conteniendo urea 2M. Se utilizó ditioneitol 45mM para la reducción de los grupos sulfidrilos y el posterior bloqueo de los mismos se realizó con iodoacetamida 100mM. Se adicionó la tripsina y/o quimiotripsina, en una relación 1:20 con la lectina, incubando la muestra a 37°C durante 24 horas (Stone et al.,1989).

3.2.7 Purificación de los péptidos por HPLC

Los péptidos resultantes de la digestión enzimática se aislaron y purificaron por HPLC en fase reversa, en un equipo de Pharmacia-LKB (Uppsala, Suecia) formado por un programador de gradientes 2152-LC, dos bombas recíprocas 2150, un inyector Reodyne (Cotati CA, Estados Unidos), un detector espectral rápido con arreglo de diodos 2140 conectado a una computadora y un registro. Se utilizó una columna Vydac C_{18} (4,6x250 mm) equilibrada con TFA 0,1% (v/v) en agua. La elución se realizó a un flujo de 0,8 ml/min. con un gradiente lineal creciente de 0 a 60% de acetonitrilo (v/v) en ácido trifluoroacético 0,1% en 100 minutos y el eluato fue monitoreado a 220 nm.

3.2.8 Análisis de aminoácidos

La composición de aminoácidos de la proteína purificada se determinó en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en Péptidos y Proteínas (LANAIS-PRO, CONICET-UBA), en un analizador de aminoácidos de Applied Biosystems (Foster City

CA, Estados Unidos) modelo 420A, que automáticamente lleva a cabo la hidrólisis, derivatización y separación de los feniltiocarbamil-aminoácidos formados.

3.2.9 Secuenciación de péptidos

La secuenciación de proteínas a partir del extremo N-terminal se realizó en el LANAIS-PRO, en un secuenciador automático de Applied Biosystems (Foster City CA, Estados Unidos) modelo 477A, equipado con un analizador de feniltiohidantoínas modelo 120^a. Los péptidos seleccionados, provenientes de la purificación por HPLC, se sembraron en un filtro de vidrio recubierto con polibreno y se secuenciaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los polipéptidos unidos a las membranas de PVDF se secuenciaron según las recomendaciones de Reim et al. (1992).

La alineación de secuencias de los péptidos de la galectina-1 obtenida, con las correspondientes estructuras primarias de varias galectinas, se realizó utilizando el banco de datos SWISS-PROT.

3.3. Caracterización parcial de la galectina de neutrófilos porcinos

3.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se efectuó la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes, o sea en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1%, según el método de Laemmli (Laemmli, 1970), a los efectos de evaluar el grado de pureza de las

muestras obtenidas en 3.1.5 y el peso molecular de la subunidad proteica de las galectinas en estudio. Las condiciones de la corrida fueron las que se describieron en el ítem 3.2.1.

Los geles se tiñieron con coloración argéntica para aumentar la sensibilidad siguiendo la técnica descrita en Blum et al. (1987). El método se basa en dos propiedades químicas del $S_2O_3^{2-}$: mejoramiento de la imagen por pretratamiento de geles fijados y formación de complejos solubles de Ag que eliminan el fondo inespecífico (precipitación de sales insolubles de Ag) durante el desarrollo de la imagen. La sensibilidad es del orden de los 2 nanogramos.

Se fijó con 100 ml de solución fijadora (metanol 50 ml, ácido acético 12 ml, formaldehído 37% 50µl, H₂O csp 100 ml) durante 1 hora o una noche para prevenir difusión de proteínas y disminuir fondo. Se lavó tres veces (20 minutos cada una) con solución de lavado (etanol 30%) para remover el ácido acético. Se trató con solución de pretratamiento ($S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ 0,03 g, H₂O desionizada csp 150ml) durante 1 minuto exacto. Se lavó tres veces con agua bidestilada durante 20 segundos cada vez para remover el exceso de $S_2O_3^{2-}$. Luego se trató con solución de Ag (NO_3Ag 0,2g, formaldehído 37% 75µl, H₂O desionizada csp 100 ml) durante 20 minutos. Se lavó con agua bidestilada 2 veces durante 20 segundos cada una para remover el exceso de NO_3Ag , el cual podía consumir el $S_2O_3^{2-}$ del paso siguiente. Se sumergió el gel en la solución de desarrollo (Na_2CO_3 6 g, solución de pretratamiento 1 ml, formaldehído 37% 50 µl, agua desionizada csp 100 ml) hasta que no aparecieron más bandas durante aproximadamente 2 minutos; la reacción se detuvo sumergiendo el gel en una solución

que contiene: metanol 10 ml, ácido acético 12 ml, agua desionizada csp 100 ml, durante 10 minutos.

Los geles se conservaron por varias semanas en metanol 30% a 4 °C.

3.3.2 *Immunoblotting*

Siguiendo la técnica descrita en 3.2.4 se identificaron las galectinas de polimorfonucleares porcinos por *immunoblotting* usando como primer anticuerpo antigalectina de bazo porcino obtenida en conejo y revelando con anti-IgG de conejo obtenido en oveja conjugada con peroxidasa.

3.3.3 Cromatografía de exclusión molecular

Se realizó en colaboración con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel). Se siguió el procedimiento descrito en 3.2.5.

3.3.4 Digestión enzimática

Se realizó en colaboración con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel). Se siguió el procedimiento descrito en 3.2.6.

3.3.5 Purificación de los péptidos por HPLC

Se realizó en colaboración con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel). Se siguió el procedimiento descrito en 3.2.7.

3.3.6 Análisis de aminoácidos

Se realizó en colaboración con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel). Se siguió el procedimiento descrito en 3.2.8.

3.3.7 Secuenciación de péptidos

Se realizó en colaboración con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UBA (Dra. Carlota Wolfenstein de Todel). Se siguió el procedimiento descrito en 3.2.9.

3.4. Efecto de la galectina esplénica porcina sobre neutrófilos homólogos

Previamente se realizaron recuentos de glóbulos blancos totales y el recuento diferencial en sangre periférica (anticoagulada con heparina) en 20 cerdos de 6 meses. Las determinaciones se realizaron en un contador Coulter JT (Beckman-Coulter Corp., Fullerton CA, Estados Unidos).

Se estudiaron 102 animales en total en los diferentes experimentos.

3.4.1 Obtención de polimorfonucleares (PMN) porcinos

Se aislaron PMN siguiendo la técnica descrita en 3.1.3 y se recontaron en contador hematológico.

Luego se determinó la viabilidad celular mediante el test de exclusión del colorante azul de tripan a t.a. Las células muertas incorporan el colorante y se observan azuladas. Se mezclaron 50µl de azul tripan GIBCO al 0,4%, 50 µl de Hanks y 20 µl de la suspensión de PMN. Se recontaron las células vivas y muertas antes de los 5 minutos en una cámara hemocitométrica.

Un cuadrante de la cámara hemocitométrica tiene un volumen de $0.1 \text{ mm}^3 = 10^{-4} \text{ cm}^3$. Se contaron los cuatro cuadrantes y se obtuvo un promedio de PMN viables por cuadrante: considerando el factor de dilución de los PMN en el tripan que fue de 6 veces. Por lo tanto el número de PMN viables está representado por la ecuación:

$$\text{Células viables} = [\text{promedio de PMN viables}] \times 10^4 \times \text{factor de dilución de PMN}$$

3.4.2 Medición de la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa

La producción de superóxidos por los PMN aislados en 3.4.1 se estudió mediante el ensayo de citocromo c según la técnica descrita en Curnutte et al. (1975), Markert et al. (1984) y Mayo et al. (1990), que se basa en la reducción por superóxidos del citocromo c férrico a citocromo c ferroso, resultando en un cambio de absorbancia (Abs) a 550 nm.

Se obtuvo una suspensión de PMN en solución salina de Hanks a partir de sangre porcina heparinizada como se describe en 3.4.1.

Se realizaron estudios previos sobre el efecto de citochalasin B, fMLP y PMA durante la puesta a punto del método con el objetivo de conocer el efecto de cada uno de los componentes empleados.

Para determinar la V_{max} de la enzima NADPH-oxidasa, la reacción se efectuó en dos cubetas de un espectrofotómetro Shimadzu 1601 (Shimadzu, Kioto, Japón) de doble haz a 37°C. El volumen final de cada mezcla de incubación fue de 1 ml, conteniendo una concentración final de $2,6 \times 10^6$ neutrófilos/ml. Para cada activador estudiado, se utilizaron dos cubetas, una experimental y la otra de referencia, ambas conteniendo citocromo c concentración final de 75 μ M. La cubeta de referencia contenía además 60 μ g/ml de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Cuando se utilizó fMLP (formil-metionin-leucil-fenilalanina) o galectina-1 como activadores se agregó en todas las cubetas citochalasin B en una concentración final de 5 μ g/ml, incubando 5 minutos a 37°C. Se determinó la absorbancia a 550 nm cada 20 segundos durante 200 segundos a los efectos de determinar la producción basal de anión superóxido en los PMN no estimulados. Luego se agregaron 2,5 μ l del activador (PMA, fMLP *Viscum album*, o lectina en diferentes concentraciones), o de Hanks para los controles. Se determinó la absorbancia a 550 nm cada 20 seg durante 200 segundos a los efectos de determinar la V_{max} de la enzima NADPH-oxidasa que se expresa como nmoles O_2^- /min/ 10^7 PMN.

Se siguió el protocolo que se muestra en la Tabla 5 para la medición de superóxidos.

La concentración de galectina-1 esplénica porcina se utilizó en las concentraciones

finales de 2,5, 5 y 10 μM . También se realizaron ensayos de inhibición bloqueando la lectina previamente con lactosa 100 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 5. Protocolo para la medición de superóxidos

Cubeta control con SOD		Cubeta experimental (sin SOD)	
Reactivo stock	Volumen (μl)	Reactivo stock	Volumen (μl)
PMN con 5×10^6 célula/ml	535	PMN con 5×10^6 célula/ml	535
Stock citocromo c	265	Stock citocromo c	265
Stock SOD	50	H ₂ O destilada	50
Stock citochalasin B o Hanks, según activador	50	Stock citochalasin B o Hanks, según activador	50
Si se usó citochalasin B: incubar 5 minutos a 37°C Leer absorbancia a 550nm para PMN no estimulados			
Activador o Hanks	2,5	Activador o Hanks	2,5
Leer absorbancia a 550nm para PMN estimulados			

a) Cálculo de la producción de nmoles de anión superóxido

Se calculan por cubeta antes y después de agregar el activador.

Cálculo de nmoles $\text{O}_2^-/10^7$ PMN en cada cubeta:

$$\text{Absorbancia} = \epsilon \times \text{paso de cubeta} \times C$$

Donde ϵ = coeficiente de extinción del citocromo c = $29,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ C = concentración de citocromo c reducido, producido en la reacción.

$$\text{Absorbancia} = 29,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times C$$

Por lo tanto, $C = \text{Abs} \times 0,03 \text{ mM}$

$$C = 33,90 \mu\text{M} \times \text{Abs}$$

El volumen total de las cubetas no estimuladas fue de 997,5 μl y el de las cubetas con activador de 1 ml, entonces los nmoles producidos en la reacción fueron:

$$1000 \text{ ml} \text{ — } 33,90 \mu\text{moles} \times \text{Abs}$$

$$0,99 \text{ ml} \text{ — } 33,81 \text{ nmoles} \times \text{Abs}$$

O bien:

$$1000 \text{ ml} \text{ — } 33,90 \mu\text{moles} \times \text{Abs}$$

$$1 \text{ ml} \text{ — } 33,90 \text{ nmoles} \times \text{Abs}$$

Esta cantidad de nmoles de citocromo c reducido fueron producidos por los $2,6 \times 10^6$ PMN no activados o activados contenido en cada cubeta. Los nmoles de citocromo c producidos por 10^7 PMN fueron:

$$2,6 \times 10^6 \text{ PMN} \text{ — } 33,81 \text{ nmoles} \times \text{Abs}$$

$$10^7 \text{ PMN} \text{ — } 127,12 \text{ nmoles} \times \text{Abs}$$

Luego se restaron a los nmoles de citocromo c reducido producidos por los PMN activados, los nmoles de citocromo c reducido producidos por los PMN no activados (controles en Hanks):

[nmoles $O_2^{-1}/10^7$ PMN] activados- [nmoles $O_2^{-1}/10^7$ PMN] controles

Luego se calculó la V_{max} ($O_2^{-1}/\text{min}/10^7$ PMN) utilizando los nmoles calculados anteriormente.

b) Efectos combinados de diferentes estimuladores

Se preactivaron los PMN con galectina-1 de bazo porcino $1 \mu\text{M}$ por 30 minutos a 37°C y luego se estimularon con concentraciones bajas de PMA (0.1 , 0.01 , 0.001 y $0.0001 \mu\text{M}$) a 37°C siguiendo el protocolo que se muestra en la Fig. 11.

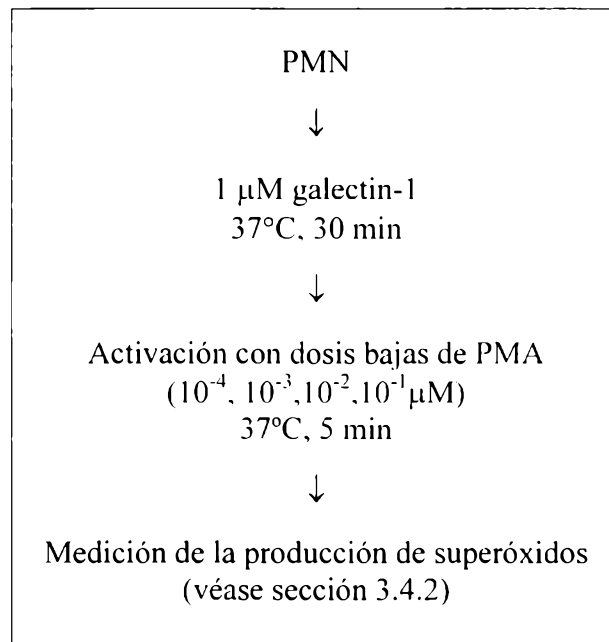


Fig. 11. Protocolo de estimulación de PMN con galectina-1

Como control se preincubaron PMN con solución salina de Hanks en las mismas condiciones y luego se siguió con el protocolo anterior.

c) Inhibición de la actividad de NADPH-oxidasa

Se realizó un calentamiento controlado a 46°C de los PMN que inactiva selectivamente el factor citosólico de la oxidasa p67^{phox} (Erickson et al., 1992) entre 0 y 10 min y luego se incubaron con y sin PMA (concentración final de 200 ng/ml).

3.4.3 Medición de la liberación de lisozima

La actividad de la lisozima liberada de los gránulos de PMN se midió por la velocidad de lisis de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* que se evaluó como descenso de la absorbancia de una suspensión a 450 nm según la técnica descrita por Yoshimura et al. (1987) y por Timoshenko et al. (1995a).

Se obtuvo una suspensión de PMN en Hanks a partir de sangre porcina heparinizada como se describe en 3.4.1.

Este ensayo se efectuó en dos etapas: primero, se realizó la estimulación de la liberación de lisozima a partir de los gránulos del neutrófilo y después se cuantificó la enzima liberada, como se mencionó mediante la lisis de la bacteria.

Se realizaron estudios previos sobre el efecto de citochalcina B, fMLP y PMA durante la puesta a punto del método con el objetivo de conocer el efecto de cada uno de los

componentes empleados.

a) Degranulación

Para la degranulación, un volumen de 100 μ l de una suspensión de neutrófilos conteniendo $7,5 \times 10^6$ células/ml, se preincubó con 25 μ l citochalcasina B en el caso de que el activador sea fMLP o galectina-1 o con 25 μ l de solución salina de Hanks para PMA en una concentración final de 5 μ g/ml, durante 5 min a 37°C. Después de la preincubación, se agregaron 25 μ l de una concentración adecuada de cada activador a estudiar (fMLP, PMA o lectina) o de solución de Hanks para el tubo control (concentración final de células: 5×10^6 /ml). Se incubó 20 min a 37°C, se detuvo la reacción enfriando en hielo. Se centrifugó 15 min a 900 xg, y los sobrenadantes se mantuvieron en hielo hasta efectuar el ensayo de actividad enzimática (en algunos casos se mantuvieron congelados a -20°C hasta un máximo de 7 días). Paralelamente se preparó el tubo blanco preincubando con 25 μ l de citochalcasina B si el activador es fMLP o galectina-1 o Hanks para PMA y luego con 25 μ l de Hanks y el tubo que representa el 100% de liberación de lisozima que se preparó preincubando 100 μ l de la suspensión de PMN con 25 μ l de citochalcasina B o Hanks y luego con Triton X-100 en concentración final de 0,2% en Hanks.

b) Medición de la lisozima

La actividad de la lisozima se midió por la velocidad de lisis de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus*, cepa Código n° ATCC 4698, provisto por el Instituto Malbrán, sembrada

en tripteína soya (tripteína soya 15,0 g, peptona de soya 5,0 g, cloruro de sodio 5,0 g y agar 15,0 g). Se utilizaron cultivos de la bacteria de menos de 5 días y se obtuvo una suspensión en buffer fosfato 0,1M, pH 6,2; se midió la turbidez a 450 nm ajustándola a $Abs_{450nm} = 0,600$. Se incubó 1 ml de dicha suspensión bacteriana con 50 μ l de la muestra enzimática, a 25°C y se determinó la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro a intervalos de 30 seg durante 4 min a 25°C (Timoshenko et al., 1995a). La liberación de enzima inducida por la galectina esplénica porcina, el fMLP o PMA se expresó como porcentaje de la actividad enzimática total de la lisozima medida al exponer los neutrófilos al detergente Triton X-100, en una concentración final de 0,2% en Hanks, en presencia o ausencia de 5 μ g/ml de citochalasina B.

Los tratamientos con el tripéptido fMLP se efectuaron en presencia y en ausencia de citochalasina B (CB, 5 μ g/ml) a diferentes concentraciones (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-1} , 1, 5, 10 μ M).

El PMA se utilizó en concentraciones de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 0,162, 1,62 μ M y en ausencia de citochalasina B.

La galectina-1 de bazo porcino se utilizó en concentraciones 0,5 – 10 μ M.

En la Tabla 6 se muestra el protocolo seguido para la medición de la liberación de lisozima.

Tabla 6. Protocolo para la medición de la liberación de lisozima

Tubo	Blanco	Actividad de lisozima (100%)	Muestra
Suspensión de PMN 7.5×10^6 células /ml	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Citochalasina B(según activador utilizado) o Hanks	25 μ l	25 μ l	25 μ l
Incubar 5 minutos a 37°C			
Hanks	25 μ l	no	no
Tritón X-100	No	25 μ l	no
Activador (tripéptido fMLP, PMA a diferentes concentraciones)	No	no	25 μ l
Incubar 20 minutos a 37°C y detener la reacción en hielo.			
Centrifugar 15 minutos a 900 xg y separar el sobrenadante que contiene la enzima.			

c) Efectos combinados de diferentes estimuladores

Posteriormente, se evaluó el posible efecto potenciador de la galectina-1 sobre PMN sometidos a un pretratamiento o *priming* con lectina y luego activados con PMA.

El *priming* de los neutrófilos se realizó incubando los PMN porcinos con galectina-1 (1 μ M) durante 15 y 30 minutos a 37°C y posteriormente se siguió con el protocolo indicado para PMA. Se emplearon concentraciones bajas de PMA (10^{-4} a 10^{-1} μ M).

3.4.4 Actividad fagocítico-lítica de polimorfonucleares

a) Preparación de los PMN

Se separaron los PMN para el ensayo de fagocitosis y lisis siguiendo la técnica descrita en Giuntoli JM et al. (1984) para lo cual se colocó 1 ml de sangre periférica recién extraída sobre portaobjetos y se incubó 2 horas a 37°C en cámara húmeda. Se eliminó el coágulo y se lavaron los portaobjetos suavemente con medio de cultivo RPMI 1640 precalentado a 37°C.

En otros casos se procedió a separar los PMN siguiendo la técnica descrita en 3.1.3 y luego se adhirieron los PMN al vidrio incubando una suspensión de neutrófilos de 5×10^3 células por ml de plasma homólogo, durante 30 minutos a 37°C.

b) Preparación de la suspensión de candidas

Las candidas (*Candida pseudotropicalis*) se sembraron en medio de agar Sabouraud en pico de flauta y se cultivaron durante 12 horas, luego se repicaron en medio Sabouraud líquido y se cultivaron durante 8 horas. Se lavaron con solución salina de Hanks (HBSS) por centrifugación para eliminar los restos del medio de cultivo. Se preparó una suspensión en medio RPMI 1640, se recontaron en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 10×10^6 candidas/ml. Luego se opsonizaron con plasma homólogo (100 μ l por cada 5×10^6 candidas/ml).

c) Ensayo de fagocitosis y lisis

Sobre los portaobjetos a los que se han adherido los PMN se colocó 1 ml de la suspensión de candidas preparada según 4.4.2. Se incubaron con las células durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

Al finalizar el período de incubación las levaduras no fagocitadas se eliminaron por lavado con medio RPMI 1640 precalentado a 37°C. Los preparados se secaron al aire y se colorearon con May Grunwald-Giemsa (1 minuto con MG y 3-4 minutos con Giemsa diluido 1/10). Luego se recontaron con un microscopio óptico. Se obtuvieron fotografías de los mismos con un microscopio marca: LEICA, modelo DMLB con el software LEICA DC 100.

La actividad fagocítica (AF) se midió como el número de Cp (*Candida pseudotropicalis*) fagocitadas por 100 PMN, la actividad lítica (AL) como el número de candidas lisadas cada 100 PMN, el índice fagocítico lítico (IFL) como el número de Cp lisadas/Cp fagocitadas. Las candidas lisadas se observan como imágenes fantasmas no teñidas por el colorante.

3.5. Unión de galectina-1 exógena de bazo porcino a neutrófilos y detección de galectina-1 endógena

3.5.1 Unión a neutrófilos humanos

a) Estudios de agregación

Se obtuvieron los PMN humanos según la técnica detallada en 3.1.3. Se preparó una suspensión de una concentración de 9×10^6 PMN/ml en PBS-albúmina 0,1% para obtener una concentración final en cada tubo de 3×10^6 PMN/ml.

Tabla 7. Protocolo para estudios de agregación de PMN

Nº de tubo	Galectina-1 (concentración final)	PBS	PBS-Albúmina 0,1%	PMN (concentración final 3×10^6 PMN/ml)
Control	-	25 μ l	25 μ l	25 μ l
1	25 μ l (0,001 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
2	25 μ l (0,010 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
3	25 μ l (0,050 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
4	25 μ l (0,100 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
5	25 μ l (0,250 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
6	25 μ l (0,500 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
7	25 μ l (0,820 μ M)	--	25 μ l	25 μ l
8	25 μ l (1,700 μ M)	--	25 μ l	25 μ l

Se incubaron las mezclas durante 30 minutos a t.a..

Se incubó esta suspensión con diferentes concentraciones de galectina-1 de bazo de cerdo o PBS como control siguiendo el protocolo que se presenta en la Tabla 7.

Después de la incubación se colorearon las células agregando a cada tubo 5 μ l de azul de metileno al 1%, se cargaron las suspensiones celulares en cámara de Neubauer y se recontaron las células libres en tratados y controles al microscopio óptico (240X). Se calculó el porcentaje de células libres de los tratados con respecto al control. Asimismo se colocó una gota de muestra entre porta y cubreobjeto y se contó el número de células presentes en cada agregado. Se obtuvieron fotografías de los PMN agregados a 600X y 130X.

b) Estudios por citometría de flujo en neutrófilos humanos en reposo y activados

Se estudió la unión de galectina-1 obtenida de bazo porcino a neutrófilos humanos en reposo y activados por citometría de flujo. Paralelamente, se hicieron ensayos para determinar la presencia de galectina-1 endógena en PMN humanos, utilizando suero antigalectina-1 de bazo porcino obtenido en conejo.

- *Purificación de PMN:* se purificaron PMN a partir de sangre humana anticoagulada con EDTA empleando un gradiente de Ficoll y sedimentación en dextran siguiendo la técnica descrita en 3.1.3. Las células purificadas se lavaron con PBS y se suspendieron en PBS-albúmina 0,1%, se recontó en contador hematológico Coulter y se llevó a una concentración final de 2×10^6 células por ml.

- *Activación de los PMN:* los PMN se activaron con PMA (10 ng/ml) durante 5 minutos a 37°C y con fMLP (1µM) durante 5 minutos a 37°C. en este caso se incubaron previamente con citochalasina B (5 µg/ml) 5 minutos a 37°C.
- *Detección de ligandos totales:* se incubaron 50 µl de suspensión de PMN en reposo o activados como se indicó en 3.5.2.b (2x10⁶/ml) con 50 µl de galectina-1 de bazo de cerdo (concentración final 0,0001, 0,001, 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 y 20,0 0 µM) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con PBS-albúmina 0,1% (5 minutos 170 xg). Se incubó luego con suero antigalectina-1 de bazo de cerdo obtenida en conejo diluida 1/100 en PBS-albúmina 0,1% durante 30 minutos en hielo y se lavó 2 veces con PBS-albúmina 0,1% (5 minutos a 170 xg). Se realizó luego la incubación con 5 µl del segundo anticuerpo anti-IgG de conejo diluido 1/100 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se realizaron las lecturas en un citómetro Coulter EPICS-XL. La población de neutrófilos se seleccionó con anticuerpo anti-CD45 (Beckman-Coulter, Corp., Fullerton CA, Estados Unidos). Los resultados se expresan en porcentaje de células marcadas.

Paralelamente se prepararon cuatro tubos controles: 1) se sustituyó a la galectina-1 de bazo de cerdo por 50 µl de PBS-albúmina 0,1% para detectar la presencia de galectina endógena; 2) se sustituyó la lectina y el primer anticuerpo por PBS-albúmina 0,1% (control negativo); 3) se sustituyó la lectina y el segundo anticuerpo (control negativo) y 4) se sustituyó el primer anticuerpo con suero preinmune del conejo que se inmunizó para obtener el suero antigalectina-1 de bazo porcino.

Además se realizó un ensayo incubando con galectina-1 de bazo porcino inhibida previamente con lactosa 100 mM durante 30 minutos a t.a.

En la Tabla 8 mostramos el protocolo seguido para la detección de ligandos totales.

3.5.2 Unión a neutrófilos porcinos

a) Inmunohistoquímica

Preparación de las improntas de PMN sobre portaobjeto

Se prepararon las improntas siguiendo la técnica descrita en Cardinalli et al. (1994). Se aprovechó la propiedad que tienen los PMN de adherirse inespecíficamente al vidrio y otras superficies.

Se colocó sangre entera sin anticoagulante sobre los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados. Se incubó en cámara húmeda durante 2 horas a t.a., se retiró el coágulo con una varilla fina y se lavaron los portaobjetos con PBS.

Inmediatamente se sumergieron las improntas en una solución de albúmina bovina al 5% en buffer PBS (pH 7,2) durante 5 minutos, agitando lentamente; se descarta la solución y se repite la operación una vez más evitando permanentemente que las improntas se sequen. Luego se fijaron rápidamente en formaldehído al 5% en agua destilada (pH 6,5). Las improntas así preparadas se conservan un mes a -20°C y cuatro meses a -70°C.

Tabla 8. Protocolo para la detección de galectina endógena y ligandos totales para galectina-1 de bazo porcino en PMN humanos

Tubo nº	PMN (µl)	PMN activados con PMA o fMLP (µl)	MEPBS CINA 500mM (µl)	Galectina-1 de bazo porcino (a diferente concentración) (µl)	Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y luego lavar 3 veces con PBS-albúmina 0,1% a 4°C	PBS-albúmina (µl)	AntiGal-1 (µl)	Incubar 30 minutos a temperatura ambiente y luego lavar 2 veces con PBS-albúmina 0,1% a 4°C	Anticonejo-FITC* (µl)
1	50		50			50			no
2	50		50			50			5
3**	50		50				50		5
4	50			50			50		5
5	50			50 (gal-1 de bazo porcino inhibida)			50		5
6		50	50			50			5
7		50	50				50		5
8		50		50			50		5

* Luego de agregar el anti-IgG de conejo-FITC incubar 15 minutos en la oscuridad.

** El tubo 3 es para detectar la presencia de galectina-1 endógena

Inmunofluorescencia indirecta

Se colocó sobre la impronta de PMN 10 a 15 μ l de galectina-1 de bazo de cerdo en PBS con albúmina 5% (10 μ g/ml) o 10-15 μ l de PBS para detectar la presencia de galectina-1 endógena; se incubó 30 minutos a t.a. en cámara húmeda. Luego se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS en forma muy suave evitando desprender las células en el área de la impronta. Los lavados pueden realizarse también en cajas de Coplin con agitación suave.

Los lavados pueden realizarse también en cajas de Coplin con agitación suave. Se sacaron los portaobjetos del PBS y se secaron los bordes con papel absorbente sin tocar el sustrato y evitando que la impronta se seque completamente.

A continuación se agregó en cada pocillo una gota de suero de conejo antigalectina-1 de bazo diluido 1/100 en PBS con albúmina 5%, se incubó 30 minutos a t.a. en cámara húmeda y se realizaron dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Se retiraron los portaobjetos del buffer y se quitó el exceso de buffer con papel absorbente evitando que se sequen las improntas. se colocó en cada pocillo una gota de suero anti IgG de conejo obtenido en ratón marcado con FITC diluido 1/400 en PBS con albúmina 5% y se incubó 30 minutos a t.a. en cámara húmeda.

Se realizaron dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS, agregando unas gotas de azul de Evans en el segundo lavado y luego se quitó el exceso de buffer con papel absorbente.

Se agregó una gota de líquido de montaje y se cubrió con un cubreobjeto. Se observó en microscopio de fluorescencia marca: LEICA, modelo DMLB, lámpara 12 V 50 W y se obtuvieron fotografías con el software LEICA DC 100.

Se realizaron controles sustituyendo la galectina y el primer anticuerpo con PBS albúmina o suero preinmune, y luego se incubó con segundo anticuerpo.

3.6. Estudios preliminares de ligandos/receptores para galectina-1 de membranas de PMN humanos

Se usó sangre humana anticoagulada con ACD (aproximadamente 450 ml).

Los neutrófilos obtenidos (pureza>90%) a partir de gradiente de Ficoll-Hypaque y sedimentación en dextrán siguiendo la técnica descrita en 3.1.3, se sometieron a shock hipotónico con agua destilada para eliminar glóbulos rojos y se suspendieron en PBS.

Para obtener las fracciones de membranas se lisaron las células en buffer hipotónico (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, 65 mM mercaptoetanol, 1 mM PMSF y 30 mM lactosa) con agitación con Vortex o por sonicación. Luego se centrifugó a 1000 x g por 30 minutos para remover los núcleos.

El sobrenadante que contiene las membranas y los componentes del citosol se centrifugó a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C y el pellet de membranas que se obtuvo se trató con 0,5 ml de buffer EDTA-MEPBS pH 7.2 con tritón 1% (20 mM

fosfato de sodio, 150 mM de ClNa, 1mM PMSF, 1% de tritón, 4mM de 2 mercaptoetanol, 2 mM de EDTA) sobre hielo durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 13000 x g 10 minutos a 4°C y se obtuvo un sobrenadante que contiene las proteínas de membrana.

El sobrenadante con las membranas se desnaturalizó por calentamiento a 100°C con igual volumen de buffer de muestra Laemmli con SDS 2% por 90 segundos.

Se realizó una electroforesis en gel SDS-poliacrilamida 12% y se efectuó la transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa a 0,4 A en Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%, pH 8,3 (buffer Towbin), las membranas se bloquearon en leche 5%-PBS-Tween 20 0,05% y luego se realizó el *immunoblotting* para identificar las bandas de proteínas obtenidas. Se realizaron incubaciones en diferentes condiciones: a) con galectina-1 de bazo de porcino (10 µg/ml) durante 60 minutos, se realizaron tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS-Tween 20, 0,05% y se incubó con suero antiglectina-1 de conejo (dilución 1/100 en solución bloqueante) durante 60 minutos; se realizaron tres lavados y se incubó con IgG anticonejo marcado con peroxidasa (dilución 1/400 en solución bloqueante) durante 60 minutos, se realizaron tres lavados y la reacción se desarrolló con H₂O₂; b) como control se sustituyó la incubación con galectina de bazo porcino por PBS y luego se siguió con el protocolo anteriormente explicado; c) anti-CD45 obtenido en ratón (dilución = 1:50) durante 60 minutos, luego tres lavados de 15 minutos cada uno en PBS-Tween 20, 0,05% y se incubó con suero antirratón marcado con peroxidasa (dilución 1/250 en solución bloqueante) durante 60 minutos; se realizaron tres lavados y la reacción se desarrolló con H₂O₂.

4. Resultados

4.1 Obtención de galectina de bazo porcino

En la Tabla 9 se muestran los resultados que se obtuvieron de la cuantificación de la actividad de las muestras crudas utilizadas para purificar la lectina y de la lectina purificada.

La actividad específica del material purificado fue de aproximadamente 290 veces mayor que la del extracto crudo. Así 1 g de tejido del bazo dio un rendimiento de 2 μ g de galectina purificada.

Tabla 9. Purificación de galectina de bazo porcino

Fracción	Actividad específica (HU/mg proteína) ^a	Purificación ^b	Rendimiento (%) ^c
Fracción Citosólica	16,7 \pm 3,1	1	100
Eluido de cromatografía de intercambio iónico	82,2 \pm 63,9	1-10	62-45
Eluido de cromatografía de afinidad	5435,4 \pm 4562,6	78-676	1-7

^a Media \pm SD de 3 experimentos independientes

^b Calculado como cociente de actividades específicas.

^c Calculado como porcentaje del cociente de actividades totales.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

100
57.162

4.2. Caracterización bioquímica parcial de la galectina de bazo porcino

4.2.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

El peso molecular aproximado de la subunidad fue determinado a partir de un gráfico semilogarítmico de peso molecular versus la movilidad en SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes, obteniéndose un valor de 14kDa (Fig. 12).

En cromatografía en gel-filtración en FPLC en condiciones no desnaturalizantes se obtuvo un único pico de proteína que correspondió a un peso molecular nativo de 32 kDa, por lo tanto la galectina de bazo porcina es un homodímero.

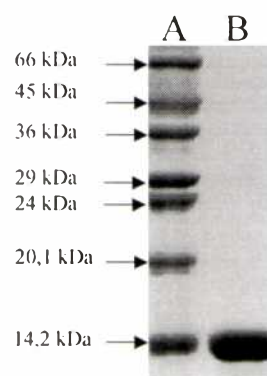


Figura 12. SDS-PAGE de la galectina de bazo porcino en condiciones desnaturalizantes. A) Los estándares de peso molecular utilizados están indicados con flechas: albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa (36 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor del tripsinógeno (20.1 kDa) y α -lactoalbúmina (14.2 kDa). B) Galectina de bazo porcino.

4.2.2 Determinación de la actividad lectínica hemoaglutinante

Se efectuaron los ensayos de inhibición de la aglutinación de la galectina purificada con

28 azúcares. Los inhibidores más potentes fueron los azúcares con configuración de β -galactósidos como tiodigalactósido, lactulosa, N-acetilgalactosamina, p-nitrofenil-lactosa y lactosa (Tabla 10). Los azúcares con configuración α -D-galactosa, como melibiosa ($\text{Gal}\alpha\text{-1-6Glc}$), rafinosa ($\text{Gal}\alpha\text{-1-6Glc}\beta\text{ 1-2Fru}$) y $\text{Gal}\alpha\text{-OMe}$ son inhibidores de la actividad de la lectina más débiles no alcanzando el 50% de inhibición. Tampoco Gal y p-nitrofenil-Gal β alcanzaron el 50% de la inhibición.

Los azúcares D-ribose, Glc, GlcNAc, Fru, Man, manitol, sorbitol, $\text{Gal}\beta\text{-OMe}$, GalNAc, ácido galacturónico, $\text{Glc}\beta\text{1-4Glc}$, $\text{Glc}\beta\text{1-4Fru}$ y NAcNeu no inhibieron la actividad de la lectina hasta concentraciones de 100 mM.

Los resultados de la Tabla 10 muestran que el sitio de unión de galectina es complementario de aquellos determinantes en posición 4 y 6 de Gal y en posición 3 de Glc en lactosa, así como el grupo acetamido de posición 2 de GlcNAc en N-acetilgalactosamina (Leffler y Barondes, 1986). En cuanto a la Gal de lactosa, la orientación axial del grupo hidroxilo 4 parece ser crítica porque la celobiosa que es idéntica que lactosa excepto por la orientación de ese hidroxilo, es inactiva como inhibidor.

En lactulosa ($\text{Gal}\beta\text{1-4Fru}$) es relevante la orientación ecuatorial del hidroxilo 3 de Glc que es igual a la del hidroxilo en Glc de lactosa. El tiodigalactósido es 7 veces más activo que lactosa, tiene un oxidrilo ecuatorial en posición 2 en lugar del oxidrilo 3 de Glc en lactosa. Probablemente el tiodigalactósido tenga dos sitios de unión por molécula por su conformación simétrica lo que explicaría su alto poder inhibitorio en comparación con la lactosa.

La N-acetil-lactosamina es dos veces más activa que la lactosa, lo que estaría indicando que el grupo acetamido en carbono 2 de la GlcNAc contribuye a la actividad como se demostró anteriormente para la galectina-1 (Leffler y Barondes, 1986; Sparrow et al., 1987). La sustitución del grupo oxidrilo en posición 1 en lactosa por el grupo p-nitrofenilo no mostró ningún efecto (Tabla 10).

Tabla 10. Inhibición de la hemoaglutinación de galectina-1 de bazo porcino, por diferentes azúcares

Inhibidor	I ₅₀ (mM) ^a
Galβ1S1βGal (TDG)	0.8
Galβ1-4Fru (lactulosa)	2.5
Galβ1-4GlcNAc (N-acetil-lactosamina)	2.6
Galβ1-4Glcβ-OPhNO ₂ (p) ^b (p-nitrofenil-Lactosa)	5.5
Galβ1-4Glc (lactosa)	5.9
Galα1-6Glc	>100
Galα1-6Glcβ1-2Fru	>100
Gal	>100
Galα-Ome	>100
Galβ-OPhNO ₂ (p)	>100

^a I₅₀: Concentración (mM) de los diferentes azúcares que dan 50% de inhibición de la hemaglutinación de glóbulos rojos de conejo tratados con neuraminidasa y fijados con glutaraldehído. Los valores fueron obtenidos por duplicado en tres experimentos independientes.

^b OPhNO₂(p) es grupo p-nitrofenil

4.2.3 Identificación de la proteína por *immunoblotting*

Los geles de SDS-PAGE de la muestra de galectina de bazo porcino purificada fueron transferidos a nitrocelulosa e incubados con anticuerpo anti-galectina-1 de bazo porcino y humano. En la Fig. 13 se muestran los resultados obtenidos en el *immunoblotting* de la galectina-1 de bazo purificada.

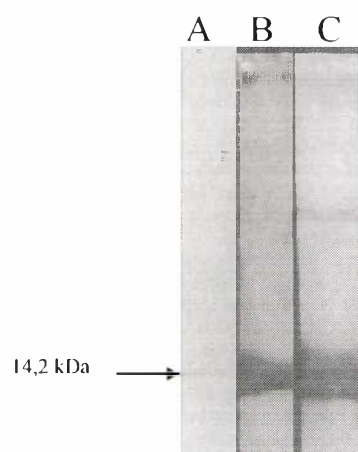


Figura 13. *Immunoblotting* de la galectina-1 de bazo porcino purificada. Los geles de SDS-PAGE fueron transferidos a nitrocelulosa e incubados en diferentes condiciones: A) con PBS; B) anticuerpo policlonal anti-galectina-1 de bazo porcino (dilución = 1:100); C) anticuerpo policlonal anti-galectina-1 de bazo humano (dilución = 1:100). El segundo anticuerpo anticonejo conjugado con HRP se diluyó 1:500.

Se observa una reacción antigénica cruzada fuerte entre galectina-1 de bazo porcino y galectina-1 de bazo humano cuando se emplearon anticuerpos policlonales de conejo contra galectina-1 de bazos porcino y humano. También se emplearon anticuerpos policlonales y monoclonales contra galectina-1 de cerebro humano (Tabla 11).

4.2.4 Purificación de los péptidos por HPLC

Se evaluó la pureza de las muestras proteicas mediante la cromatografía en gel-filtración en FPLC.

Para determinar la estructura primaria se procedió a la separación de los péptidos obtenidos por digestión enzimática por HPLC en fase reversa en columna C18. El perfil de elución se muestra en la Fig. 14.

Tabla 11. Reactividades cruzadas entre galectinas-1 detectadas por técnicas de *immunoblotting*

Anticuerpos antigalectina-1	Galectinas	
	Galectina-1 de bazo Porcino	Galectina-1 de bazo humano
Anti-bazo porcino policlonal ^a	++++	++++
Anti-bazo humano policlonal ^a	++++	++++
Anti-cerebro humano policlonal ^a	+++	++++
Anti-cerebro humano monoclonal ^b	++	++
PBS	-	-

^a El primer anticuerpo policlonal fue diluido 1/100.

^b El primer anticuerpo monoclonal (sobrenadante de células de hibridoma) fue usado sin diluir.
 Reactividad: +++++, muy fuerte; +++, fuerte; ++, débil; -, negativo.

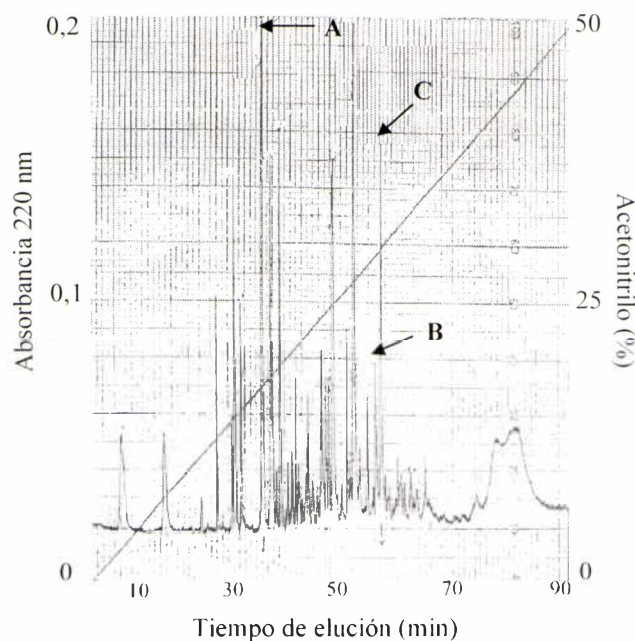


Figura 14. Perfil de elución de HPLC de los péptidos obtenidos por digestión triptica de galectina-1 esplénica. Pico A: aa 64-73 (DRC); pico B: aa 97-106; pico C: aa 29-48. Condiciones de corrida: HPLC en fase reversa en una columna C18, gradiente lineal de 0-50% de acetonitrilo.

Así, esta galectina-1 tiene secuencias que se superponen con las de galectina-1 de diferentes vertebrados (Fig. 15). Se encuentra un alto grado de identidad con placenta ovina (98%, Iglesias et al., 1998), fibroblastos bovino (95%, Abbott et al., 1989), placenta humana (93%, Hirabayashi y Kasai, 1988), pulmón de rata (88%, Clerch et al., 1988) y fibroblastos de ratón (83%, Wilson et al., 1989).

4.3. Caracterización bioquímica parcial de la galectina de neutrófilos porcinos

4.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

En la electroforesis en SDS-PAGE 12% de la muestra purificada y liofilizada se detectó la presencia de 2 bandas con tinción argéntica, de peso molecular aproximado de 14kDa y 30 kDa que podrían representar las subunidades de galectina-1 y el dímero no disociado (Fig. 16). En el *immunoblotting* con anticuerpo policlonal de conejo antigalectina-1 de bazo porcino (dilución=1:100) como primer anticuerpo y con anticonejo conjugado con HRP (dilución = 1:500) como segundo anticuerpo, se observó una banda a 14ka (Fig. 17).

4.3.2 Cromatografía de exclusión molecular

Se evaluó la pureza de las muestras proteicas mediante la cromatografía en gel-filtración en FPLC (Fig. 18) y se obtuvo un solo pico (de PM 32 kDa), lo que correspondería a un

homodímero. Así se descartó que en las condiciones experimentales empleadas se estuviera ante la presencia de otro miembro de la familia de las galectinas.

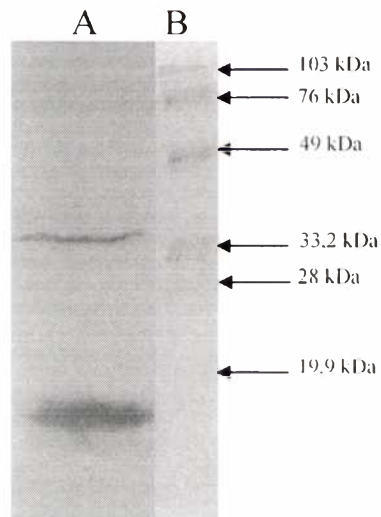


Figura 16. A) Electroforesis en SDS-PAGE 12% de galectina de PMN, tinción argéntica. B) Los estándares de peso molecular utilizados están indicados con flechas: fosforilasa B (103kDa), albúmina bovina (76 kDa), ovoalbúmina (49 kDa), anhidrasa carbónica (33,2 kDa), inhibidor de tripsina (28,0 kDa) y lisozima (19,9 kDa).

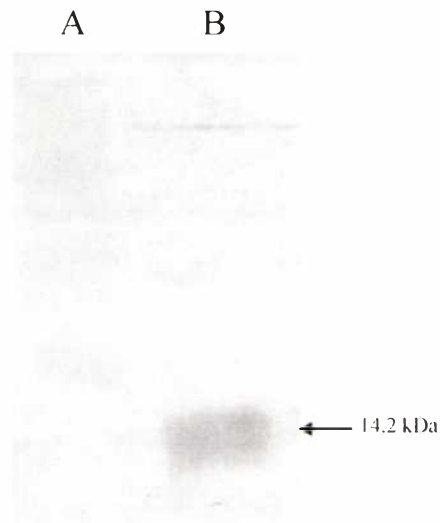


Figure 17. *Immunoblotting* de la galectina-1 de PMN porcinos. Los geles de SDS-PAGE fueron transferidos a nitrocelulosa e incubados en diferentes condiciones: A) con PBS; B) con anticuerpo policlonal antigalectina-1 de bazo porcino (dilución = 1:100). El segundo anticuerpo anticonejo conjugado con HRP se diluyó 1:500.

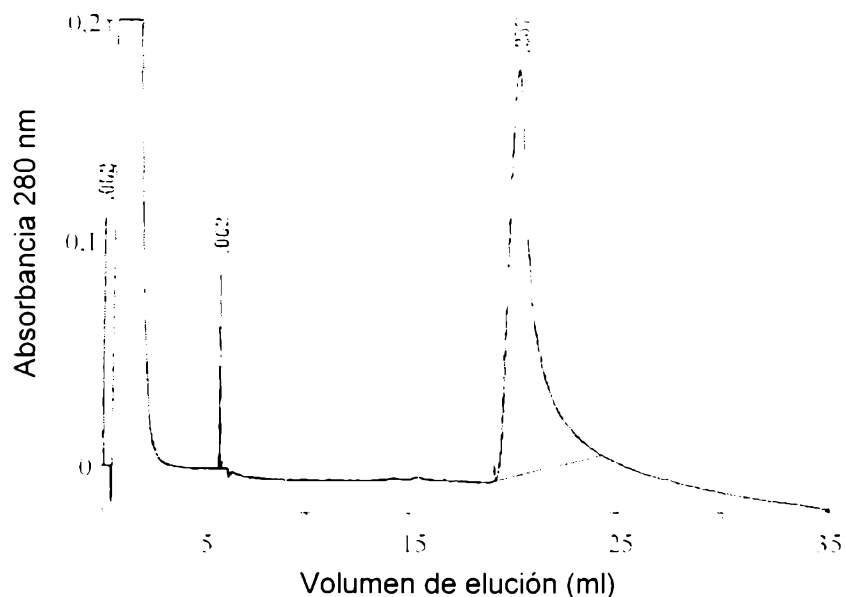


Figura 18. Cromatografía de exclusión molecular del material de PMN obtenido por afinidad en una columna de Superosa 12 HR 10/30, adaptada a un sistema de FPLC. Los marcadores de masa molecular utilizados para la calibración de la columna fueron los siguientes: azul dextrano (2000 kDa), β -amilasa de batata (200 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (29 kDa) y citocromo c equino (12,4 kDa).

a) Purificación de los péptidos por HPLC

La galectina de PMN porcina fue procesada por HPLC en fase reversa (Iglesias et al., 1998) tal como se indicó anteriormente para la galectina-1 de bazo porcino.

b) Secuenciación de péptidos

La secuencia del péptido seleccionado desde el aminoácido 29 al 48 se muestra en la Fig. 19. H, N y R son importantes en el dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC). La lectina de PMN porcina tiene el DRC que corresponde a la subfamilia de galectina-1.

	29	48
bazo	S F V L N L G K D D N N L C L H F N P R	
porcino		
neutrófilo	S F V L N L G K D S N N L C L H F N P R	
porcino		
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> ★ ★ ★ </div>
		<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> 44 46 48 </div>

Figura 19. Comparación de secuencias de aminoácidos de galectinas-1 de bazo y PMN porcino. Las letras en rojo indican los aminoácidos que difieren de los de las mismas posiciones en la galectina de PMN porcino. En amarillo (★) se indican las posiciones de los aminoácidos invariables correspondientes al dominio de reconocimiento a carbohidratos (DRC) tipo I (galectina-1).

4.4. Efectos de la galectina esplénica porcina sobre neutrófilos homólogos

4.4.1. Estudios hematimétricos

Se realizaron algunas determinaciones en sangre periférica de los cerdos, previamente a comenzar el trabajo. Se obtuvieron muestras de sangre de cerdos de 6 meses anticoagulada con EDTA y se recontaron en un contador Coulter JT. Los resultados que se obtuvieron sobre una población de 20 animales fueron los siguientes: recuento total de glóbulos blancos: $22,7 \pm 4,7 \times 10^3 / \text{mm}^3$; neutrófilos $27,7 \pm 13,8\%$; linfocitos $66,6 \pm 13,5\%$; eosinófilos $4,3 \pm 2,9\%$ por mm^3 . Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Tegeris et al. (1966).

4.4.2 Medición de la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa

a) Estudios previos sobre el efecto de citochalasin B, fMLP y PMA

Se evaluó el efecto de la citochalasin B (CB) que aumenta las respuestas frente a activadores solubles de PMN; no se conoce muy bien cuál es el mecanismo, pero se ha demostrado que existe una correlación entre la inhibición de la polimerización de la actina y un aumento en la actividad de NADPH-oxidasa (Cohen et al., 1980). La CB no indujo liberación O_2^- en neutrófilos porcinos puros.

El dimetilsulfóxido (DMSO) que se empleó como solvente de CB y de fMLP no produjo liberación de O_2^- .

Se evaluó el efecto de activadores conocidos de neutrófilos sobre la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa. Se utilizó el péptido quimiotáctico N-formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP), en concentraciones de 0,0001 a 10 μ M y forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) en concentraciones de 0,0001 a 1,62 μ M.

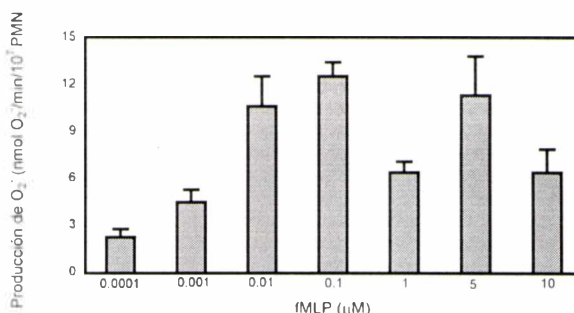
Se hicieron curvas de dosis respuesta en idénticas condiciones experimentales para ambos activadores.

Con fMLP y en presencia de CB se detectó una rápida producción de O_2^- . El efecto del fMLP no es dosis dependiente ($y = 6.2274 + 0.1696x$; $p > 0.05$ por análisis de regresión lineal). Se observaron algunas diferencias de actividad de NADPH-oxidasa estadísticamente significativas (Tabla 12).

El fMLP en concentraciones de 1 a 10 μM y en ausencia de CB no produjo liberación detectable de O_2^- (n=3).

Tabla 12. Producción de superóxido por PMN porcinos estimulados con distintas concentraciones de fMLP

Concentración de fMLP (μM)	Vmax (nmol O_2^- min/ 10^7 PMN)*
0,0001(17)**	2,3 \pm 0,5 ^a
0,001(16)	4,5 \pm 0,8 ^b
0,01(8)	10,6 \pm 1,9 ^c
0,1(11)	12,5 \pm 0,9 ^d
1(8)	6,4 \pm 0,7 ^c
5(14)	11,3 \pm 2,5 ^f
10(12)	6,4 \pm 1,5 ^e



* Media \pm EEM

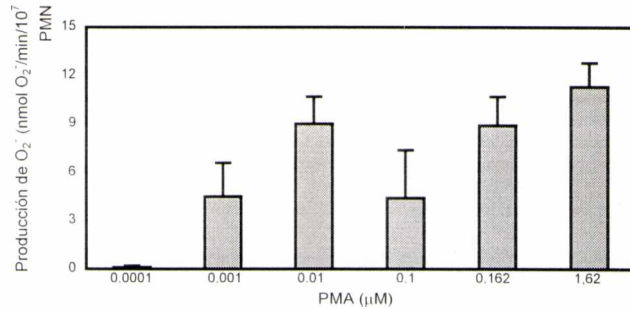
** Entre paréntesis número de animales

Diferencias significativas entre a y c, a y d, a y f, a y g, b y c, b y d, b y f, d y e, d y g, f y g (test de Mann-Whitney). Otras comparaciones fueron no significativas.

Se activó la NADPH-oxidasa con PMA en ausencia de CB (Kano et al., 1987). El efecto del PMA fue dosis dependiente ($y = 6.2960 + 2.7295x$; $p < 0.03$ por análisis de regresión lineal) (Tabla 13).

Tabla 13. Producción de superóxido por PMN porcinos estimulados con distintas concentraciones de PMA

Concentración de PMA (μM)	Vmax (nmol $\text{O}_2^-/\text{min}/10^7$ PMN)*
0,0001(3)**	0,1+0,1
0,001(5)	4,5+2,1
0,01(11)	9,0+1,7
0,1(4)	4,4+3,0
0,162(14)	8,9+1,8
1,62(11)	11,3+ 1,5



* media \pm EEM

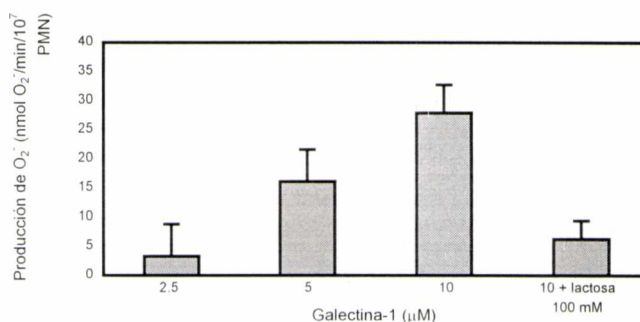
** entre paréntesis número de animales

b) Efecto de galectina-1 esplénica porcina

La galectina-1 esplénica porcina en concentración $1\mu\text{M}$ ($30\mu\text{g/ml}$), estimuló muy débilmente la producción de anión superóxido por NADPH-oxidasa ($3,6 \pm 8,8$ nmol $\text{O}_2^-/\text{min}/10^7$ PMN, $n=9$). A una concentración de $10\mu\text{M}$ la galectina-1 produjo una respuesta de superóxido significativa ($27,9 \pm 4,8$ nmol $\text{O}_2^-/\text{min}/10^7$ PMN, $n=4$) que fue parcialmente (77%) bloqueado por lactosa 100mM que es un azúcar inhibidor específico de galectina. En cuanto a las concentraciones de $2,5$ y $5\mu\text{M}$ produjeron $3,3 \pm 5,5$ y $16,1 \pm 5,5$ nmol $\text{O}_2^-/\text{min}/10^7$ PMN, respectivamente ($n=3$), el análisis de regresión lineal indica que el efecto de galectina-1 es dosis dependiente ($y=2.4527+3.1187x$; $p<0.009$) (Tabla 14).

Tabla 14. Producción de superóxido por PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de galectina-1 de bazo porcino, con y sin inhibición con lactosa 100 mM

Concentración de Galectina-1 (μM)	Vmax ($\text{nmol O}_2^-/\text{min}/10^7$ PMN)*
2,5(3)**	3,3 \pm 5,5
5(3)	16,1 \pm 5,5
10(4)	27,9 \pm 4,8
10(4) + lactosa 100mM	6,3 \pm 3,1



* Media + EEM

** Entre paréntesis número de animales

También se realizaron ensayos comparativos con otras lectinas como la aglutinina de *Viscum album*. Esta aglutinina vegetal produjo una estimulación significativa de la producción de superóxidos en concentraciones de 150 y 300 $\mu\text{g/ml}$ (3,2 \pm 0,5 y 6,2 \pm 1,6 nmol O₂⁻/min/10⁷ PMN respectivamente, n=2 (t test; p<0,05).

La producción de superóxidos en los PMN porcinos estimulados con PMA comienza entre 0,6-3 minutos según cerdo, en cambio el lag para galectina-1 es muy breve aproximadamente 0,6 minutos en todos los animales testeados.

c) Efectos combinados de diferentes estimuladores

Se realizaron experiencias para ver si el tratamiento previo de los PMN con galectina-1 de bazo de cerdo era capaz de aumentar la respuesta de producción de superóxidos frente a otros estímulos en dosis bajas, fenómeno conocido como *priming*. Los resultados obtenidos se muestran en Tabla 15.

Tabla 15. Efecto del estímulo de PMA sobre la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa en PMN preincubados con galectina-1 de bazo porcino*.

Concentración de PMA (μM)	PMN preincubados con galectina-1 de bazo porcino**	PMN preincubados con solución salina de Hanks**
0.0001 (9)***	4.1 \pm 2.3	0.9 \pm 0.8
0.001 (9)	10.1 \pm 5.7	2.1 \pm 1.1
0.01 (9)	8.6 \pm 6.7	2.5 \pm 1.3
0.1 (9)	8.9 \pm 6.6	4.2 \pm 2.1

* 1 μM , 30 minutos a 37°C)

** Media \pm EEM (nmol O_2^- /min/ 10^7 PMN)

*** Entre paréntesis número de animales

Los efectos sinérgicos de galectina-1 esplénica porcina y PMA se analizaron con diferentes tests estadísticos no paramétricos, por ejemplo el test de Mann-Witney. Se obtuvieron diferencias significativas en la producción de superóxidos entre PMN pretratados con galectina-1 y los controles no tratados ($p < 0.05$). Se observó gran variabilidad entre los diferentes animales.

d) Efecto de la temperatura sobre la actividad de la NADPH-oxidasa

También se estudió el efecto de la temperatura sobre la actividad de NADPH-oxidasa de PMN con calentamiento controlado a 46°C durante 0-10 minutos seguidos de un tratamiento con y sin PMA (concentración final: 200 ng/ml).

A los 10 minutos de tratamiento se inhibió completamente la actividad de la NADPH-oxidasa y se recuperó parcialmente por la adición de galectina-1 (3.4 μM). En la Tabla

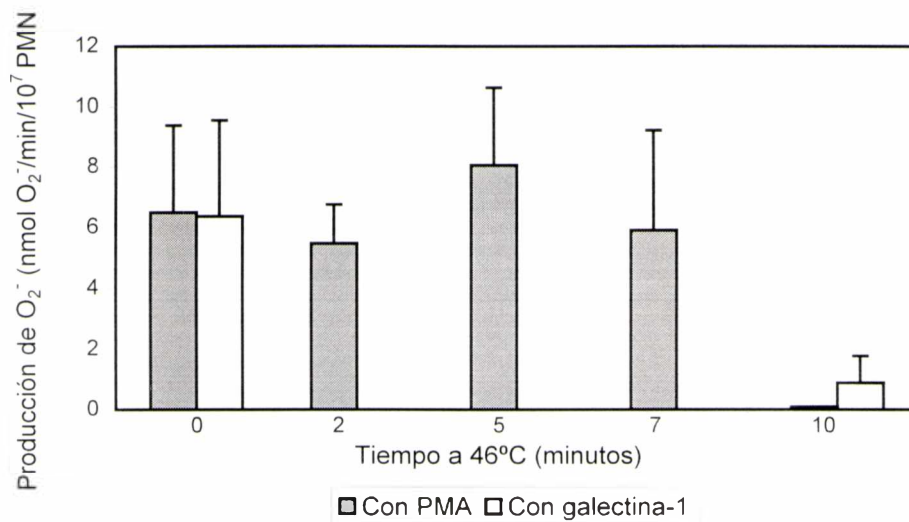
16 se observa a los diez minutos una actividad residual (14%).

Tabla 16. Efecto del calentamiento de PMN a 46 °C sobre la producción de superóxidos

Tiempo de calentamiento a 46°C (minutos)	PMN estimulados con PMA (200 ng/ml)*	PMN estimulados con galectina-1 (3,4 μM)*
0	6,49± 2,89 (5) **	6,36± 3,19 (3)**
2	5,47± 1,28 (5)	
5	8,05± 2,58 (5)	
7	5,90 ± 3,32 (5)	
10	0 (5)	0,89± 0,89 (3)

* Media ± EEM (nmol O₂⁻/min/10⁷ PMN)

** Entre paréntesis número de animales



4.4.3 Medición de la liberación de lisozima

a) Estudios previos sobre el efecto de citochalasin B, fMLP y PMA.

Para los ensayos de liberación de lisozima a partir de los gránulos azurófilos y secundarios del neutrófilo se utilizaron activadores conocidos de los granulocitos como el tripéptido fMLP en presencia y en ausencia de citochalasin B y el PMA en diferentes concentraciones.

La citochalasin B (CB) sola no indujo liberación de lisozima en neutrófilos purificados. El DMSO que se utilizó para disolver la CB, fMLP y PMA tampoco produjo liberación de lisozima.

Se estudió el efecto de fMLP en diferentes concentraciones (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-1} , 1, 5, 10 μM) sobre la liberación de lisozima en presencia y en ausencia de CB en concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 17). En ausencia de CB no se observó una regresión lineal ($p > 0,05$ según análisis de varianza) aunque si se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones 5 y 0,1 μM , entre 1 y 0,1 μM y entre 0,1 y 0,001 μM . El estímulo CB-fMLP produjo un efecto máximo a la concentración de 0,001 μM y una diferencia significativa entre las concentraciones de fMLP de 0,001 y 0,0001 μM aunque la regresión lineal fue $p > 0,05$ ($y = 20,7931 + 1,0220x$).

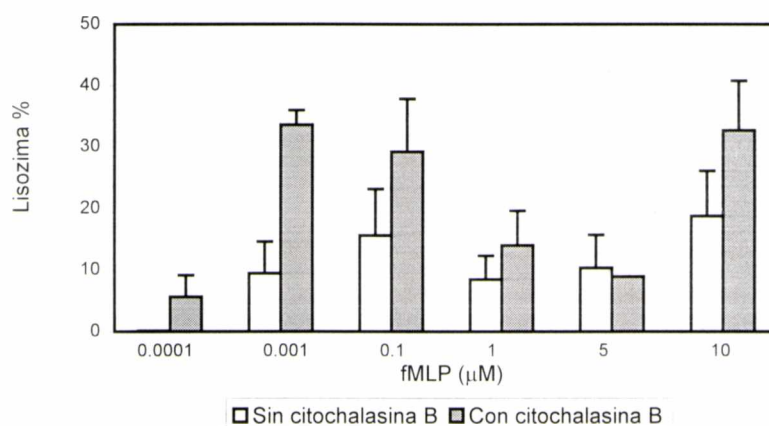
Tabla 17. Liberación de lisozima de PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de fMLP sin y con citochalasina B

Concentración de fMLP(μ M)	Lisozima (sin citochalasina B)*	Lisozima (con citochalasina B)*
0,0001	0(3)**	5,6 \pm 3,5(5)** ^c
0,001	9,4 \pm 5,2(11) ^a	33,6 \pm 2,4(12) ^f
0,1	29,2 \pm 7,5(11) ^b	15,6 \pm 8,6(2)
1	8,4 \pm 3,9(14) ^c	14,0 \pm 5,6(9)
5	10,3 \pm 5,4(7) ^d	8,9(1)
10	18,8 \pm 7,3(10)	32,7 \pm 8,1(15)

* Media + EEM (%)

** Entre paréntesis número de animales

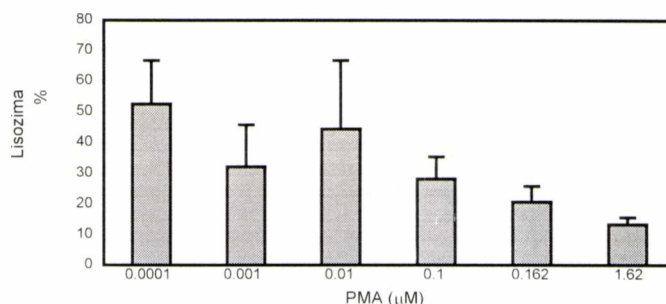
Diferencias significativas entre a y b, b y c, b y d, e y f (test de Mann-Whitney). Otras comparaciones fueron no significativas.



Se estudió el efecto del PMA sobre la degranulación de PMN porcinos a las concentraciones de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 0,162 y 1,62 μ M (n=2-21) como activador de PMN, obteniéndose un efecto máximo a la concentración 0,0001 μ M (Tabla 18). Se observó una regresión lineal que responde a la ecuación $y=30.2620-10.6679x$ ($p<0,01$).

Tabla 18. Liberación de lisozima de PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de PMA.

Concentración de PMA (μM)	Lisozima)*
0,0001(2)**	52,5 \pm 14,2
0,001(2)	32,2 \pm 13,6
0,01(2)	44,4 \pm 22,3
0,1(7)	28,2 \pm 7,2
0,162(10)	20,7 \pm 5,2
1,62(21)	13,4 \pm 2,3



* Media \pm EEM (%)

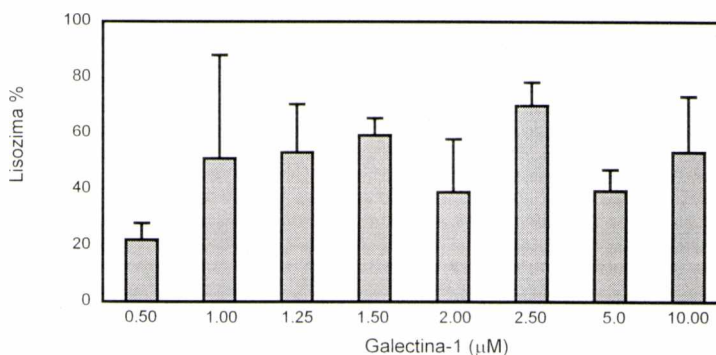
** Entre paréntesis número de animales

b) Efecto de galectina-1 esplénica porcina

A partir de los resultados obtenidos, se observó que la liberación de lisozima por PMN de cerdo estimulados con galectina-1 esplénica porcina en las concentraciones que utilizamos (0-10 μM) no tiene una relación lineal con la concentración (Tabla 19). La incubación con galectina-1 10 μM produjo una buena respuesta en cuanto a la liberación de lisozima que fue parcialmente inhibida con lactosa 100 mM (aproximadamente 50%). La regresión lineal entre concentración de galectina-1 y liberación de lisozima no se ajustó a una ecuación lineal ($y=41.9378+19.3778x$; $p>0.05$).

Tabla 19. Liberación de lisozima de PMN porcinos estimulados con diferentes concentraciones de galectina-1 de bazo porcino

Concentración de Galectina-1 (μM)	Lisozima*
0,5(2)**	22,0 \pm 6,0 ^d
1,0(2)	51,0 \pm 37,1
1,25(3)	53,1 \pm 17,5
1,5(3)	59,3 \pm 6,2
2,0(3)	39,1 \pm 18,9
2,5(6)	70,1 \pm 8,3 ^b
5(4)	39,6 \pm 7,5
10(3)	53,4 \pm 20,1



* Media + EEM (%)

** Entre paréntesis número de animales

Diferencias significativas entre a y b (test de Mann-Whitney). Otras comparaciones fueron no significativas.

c) Efecto combinado de diferentes estimuladores

Posteriormente, se evaluó el posible efecto potenciador de la galectina-1 sobre PMN sometidos a un pretratamiento o *priming* con lectina y luego activados con PMA.

El *priming* de los neutrófilos con galectina-1 (1 μM) durante 15 y 30 minutos y la posterior activación con dosis bajas de PMA (10^{-4} a 10^{-1} μM) produjeron los valores de liberación de enzima que se observan en la Tabla 20 (n=7-15). Se observa en general un aumento de la liberación de lisozima cuando se comparan los PMN preestimulados y los controles aunque no fue significativo (Mann-Whitney test, $p > 0.05$).

Tabla 20. Efecto de la preestimulación de los PMN con galectina-1 esplénica porcina sobre la liberación de lisozima en PMN homólogos activados con PMA

Concentración de PMA (μ M)	Período de preincubación con galectina-1 1 μ M			
	15 minutos		30 minutos	
	PMN preincubados con galectina-1*	PMN preincubados con HBSS	PMN preincubados con galectina-1	PMN preincubados con HBSS
0.0001	17.3 \pm 6.7 (15)**	14.2 \pm 5.3 (15)**	10.2 \pm 3.8 (7)**	14.5 \pm 8.5 (7)**
0.001	24.4 \pm 12.0 (15)	17.5 \pm 5.3 (15)	23.2 \pm 8.4 (7)	10.7 \pm 4.5 (7)
0.01	25.3 \pm 13.7 (15)	15.5 \pm 10.4 (15)	19.0 \pm 12.2 (7)	1.8 \pm 0.7 (7)
0.1	13.0 \pm 6.6 (14)	12.2 \pm 6.6 (14)	10.4 \pm 3.6 (7)	5.1 \pm 5.1 (7)

* Media \pm EEM (%)

** Entre paréntesis el número de animales

4.4.4 Fagocitosis y lisis de *Candida pseudotropicalis* por PMN porcinos

Se realizó la fagocitosis y lisis en muestras obtenidas de diferentes animales (n=4-6) frente a concentraciones de galectina-1 de bazo de cerdo de 0 a 4 μ M.

La galectina-1 de bazo de cerdo a cualquier concentración disminuye la AF en forma no significativa y produce la reducción significativa de AL (Tabla 21).

En los estudios de inhibición se demostró una disminución no significativa del número de candidas fagocitadas y lisadas cuando se incubó previamente la galectina-1 con lactosa 100 mM (p> 0,05) (Tabla 22).

En la fotografía de la Fig. 20 se observan a) PMN aislados y b) con candidas fagocitadas y lisadas fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa diluido 1/10.

Tabla 21. Efecto de galectina-1 sobre la actividad fagocítica-lítica de PMN porcinos

Concentración de galectina-1 (μM)	Actividad fagocítica ^{1,a}	Actividad lítica ²	Índice fagocítico-lítico ³
Controles (6)*	113,8 \pm 34	6,8 \pm 0,96	0,82 \pm 0,020
1(5)	91,6 \pm 37	2,2 \pm 1,05	0,054 \pm 0,022
2(4)	80,7 \pm 42	0,8 \pm 0,17	0,012 \pm 0,024
4(4)	53,2 \pm 42	1,25 \pm 1,17	0,050 \pm 0,024
Significancia (p) ^b	NS	0,002	0,04

* Entre paréntesis, número de animales

¹ Media \pm EEM (Cp fagocitadas/100 PMN)

² Media \pm EEM (Cp lisadas/100 PMN)

³ Media \pm EEM (Cp lisadas/Cp fagocitadas)

^a Diferencias no significativas entre medias (test de Mann-Whitney)

^b Correlación de Spearman; NS no significativo

Tabla 22. Efecto de la inhibición de galectina-1 sobre la actividad fagocítica y lítica de PMN porcinos

Concentración de galectina-1 (μM)	Actividad fagocítica ¹	Actividad lítica ²
1 (3)*	77,5 \pm 40,7	0,5 \pm 0,20
1+ lactosa 100 mM (3)	67,5 \pm 40,0	1,5 \pm 1,22
Significancia (p, test de Mann-Whitney)	NS	NS

* Entre paréntesis, número de animales

¹ Media \pm EEM (Cp fagocitadas/100 PMN)

² Media \pm EEM (Cp lisadas/100 PMN)

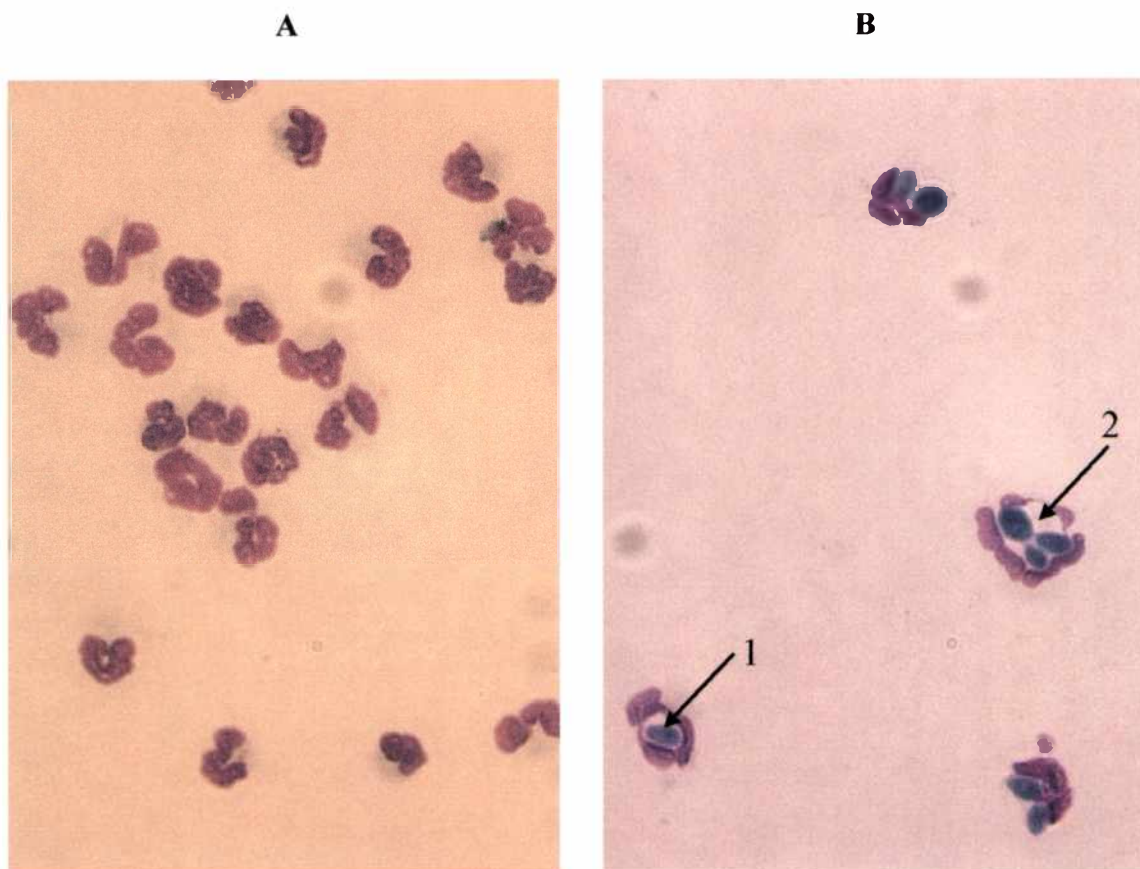


Figura 20. A) PMN aislados (coloración de Giemsa, 600X). B) PMN con Cp fagocitadas (1) y lisada (2) en el citoplasma (coloración de Giemsa; 600X).

4.5. Unión de galectina-1 exógena de bazo porcino y detección de galectina-1 endógena en PMN

En este apartado se advierte que la detección de galectina-1 endógena en PMN y de los ligandos/receptores que interactúan con galectina-1 de bazo porcino exógena, se llevaron a cabo simultáneamente en los mismos experimentos.

4.5.1 Unión a neutrófilos humanos

a) Estudios de agregación

Se demostró la agregación de PMN humanos por la galectina-1 esplénica porcina exógena. Dicha agregación parece guardar una relación dosis-respuesta significativa, según el coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0,05$) (Fig. 21 y 22). Esto indica la presencia de ligandos/receptores para la galectina-1 en la superficie del PMN humano.

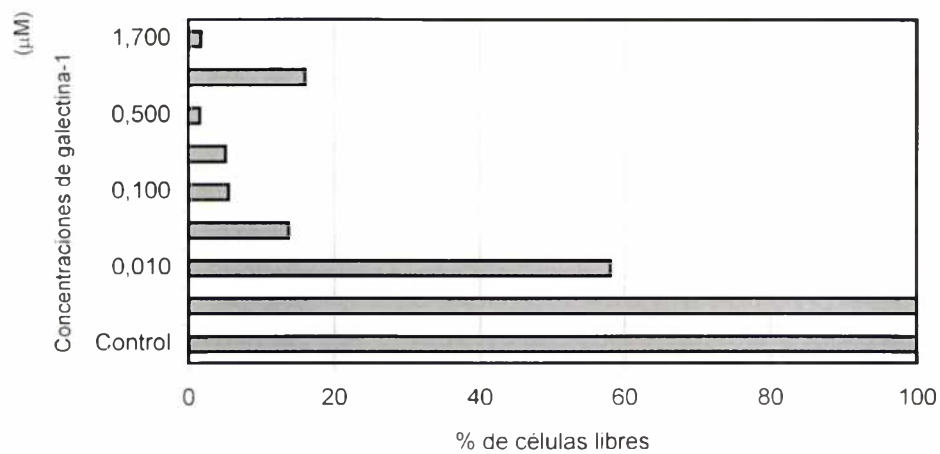


Figura 21. Agregación de PMN humanos con galectina-1 de bazo porcino. Se recontaron las células libres por microscopía óptica, luego de la incubación de los neutrófilos (3×10^6 /ml) con galectina-1 (0-1,7 μM).

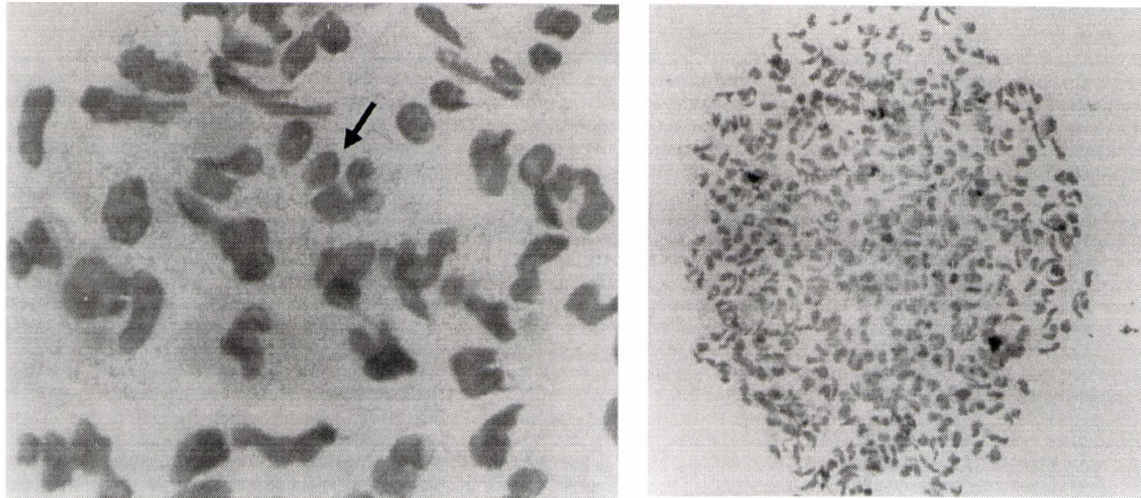


Figura 22. Fotografía de agregados de PMN humanos postincubación con galectina-1 de bazo porcino. Concentración de galectina-1: 1,7 μ M. Aumento final 660x (izquierda; \rightarrow PMN) y 130x (derecha).

b) Estudios por citometría de flujo en neutrófilos humanos en reposo y activados

Los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron un aumento de fluorescencia con respecto a los controles (PBS-albúmina 0,1% y suero preimmune), cuando se incubaron los PMN obtenidos de sangre periférica con diferentes concentraciones de galectina-1, confirmando el *binding* de la galectina-1 a la superficie del PMN humano en reposo (Tabla 23, Fig. 23A y 23C). Además se observó aumento de fluorescencia en los PMN incubados con anticuerpo antigalectina-1 y anticonejo-FITC lo que estaría indicando la presencia de galectina endógena (20% con respecto al control con PBS) (Fig. 23B). La adición de lactosa produjo un 50% de inhibición respecto de galectina-1 1 μ M (28,6 vs 60,1%).

Tabla 23. Unión de galectina-1 de bazo porcino a PMN humanos en reposo por citometría de flujo

Concentración de galectina-1 (μ M)	% de marcación en PMN libres ^c	% de marcación en PMN agregados ^c	Relación PMN agregados/PMN libres
20 (2) ^a	88,1-95,5	100-93,8	0,06-0,04
10 (3)	60,9 \pm 31,5	100	0,12 \pm 0,1
5 (3)	47,2 \pm 33,0	95,5 \pm 2,0	0,30 \pm 0,2
2,5 (4)	55,2 \pm 25,5	96,5 \pm 1,9	0,28 \pm 0,1
1,0 (4)	60,1 \pm 29,2	95,2 \pm 3,9	0,41 \pm 0,2
0,5 (3)	65,8 \pm 26,2	97,1 \pm 3,9	0,26 \pm 0,1
0,25 (3)	84,2 \pm 7,20	99,3 \pm 0,6	0,21 \pm 0,0
0,1 (3)	69,4 \pm 25,9	86,3 \pm 22,5	0,28 \pm 0,1
0,05 (3)	43,7 \pm 37,8	70,4 \pm 51,2	0,17 \pm 0,1
0,01 (3)	64,9 \pm 25,2	99,0 \pm 0,9	0,19 \pm 0,1
0,001 (3)	62,3 \pm 21,2	99,1 \pm 0,2	0,13 \pm 0,1
0,0005 (3)	37,04 \pm 33,14	67,79 \pm 54,67	0,02 \pm 0,01
0,0002 (3)	40,37 \pm 31,26	67,67 \pm 41,20	0,02 \pm 0,0
0,0001 (4)	29,32 \pm 29,55	54,15 \pm 50,11	0,06 \pm 0,09
0 (3) ^b	1,8 \pm 1,1	nd	nd
Suero preinmune (3)	3,8 \pm 5,3	-	-

^a Entre paréntesis , número de animales

^b PMN incubados con PBS-albúmina 0,1% y anticonejo-FITC

^c Media \pm DE

nd No detectado porque no se observan células agregada

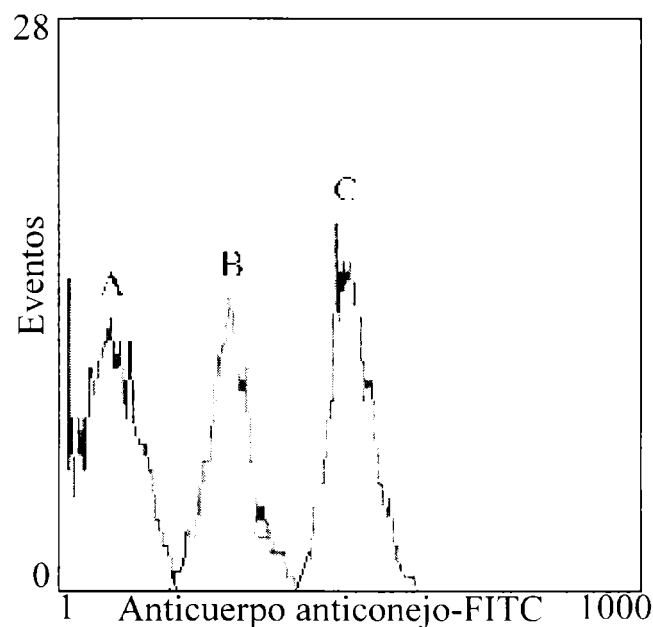


Figura 23. Histogramas representativos de citometría de flujo (Coulter EPICS-XL). A: Control: PMN humanos incubados con PBS-albúmina 0,1% y suero anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (anticonejo-FITC) como segundo anticuerpo. B: PMN, PBS-albúmina 0,1%, suero antigalactina-1 (primer anticuerpo) y suero anticonejo-FITC (galactina endógena). C: PMN incubados con galactina-1 0,0002 μ M, suero antigalactina-1 y suero anticonejo- FIAC (ligandos).

También se observó que la preincubación con PMA y fMLP (con y sin citochalasina B) produjo un aumento significativo de la fluorescencia con respecto al control con PBS-albúmina 0,1%, cuando se incubó con galactina-1 (0-2,5 μ M) lo que estaría indicando la exposición de ligandos presentes en los gránulos del PMN (Fig. 24 y 25).

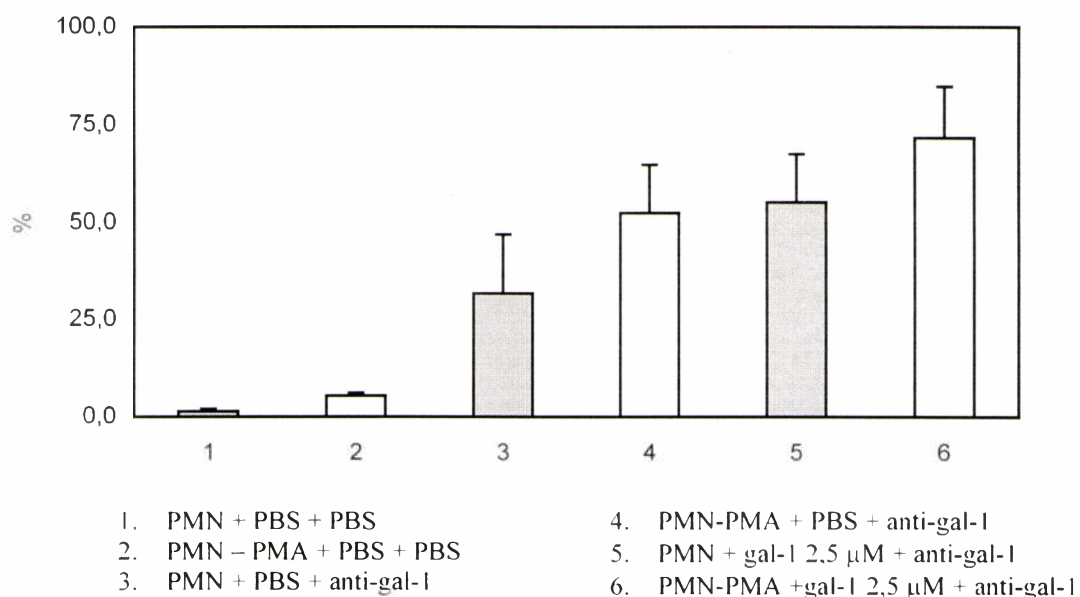


Figura 24. Efecto de la preincubación de PMN humanos con PMA (10 ng/ml) sobre la unión de galectina-1 de bazo porcino. La comparación mediante ANOVA 1 vs 2, 2 vs 4 y 2 vs 6 dieron diferencia significativa ($p < 0,05$). Los resultados corresponden a 4 experimentos \pm SEM.

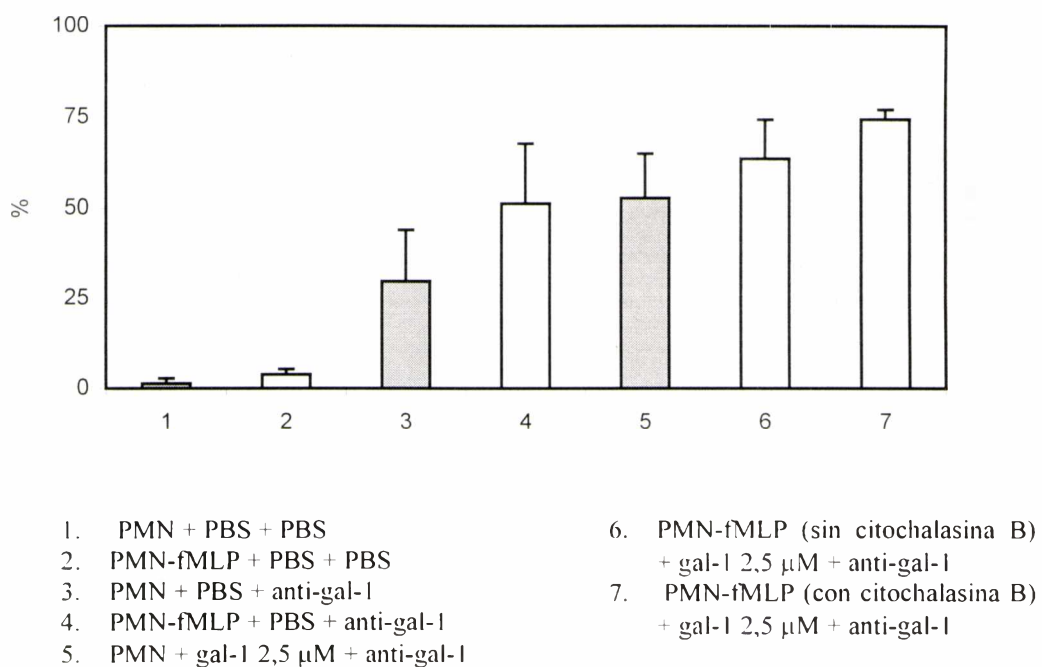


Figura 25. Efecto de la preincubación de PMN humanos con fMLP (1 μM), con y sin citochalasina B). La comparación mediante ANOVA 1 vs 5, 2 vs 4, 2 vs 6 y 2 vs 7 dieron diferencia significativa ($p < 0,05$). Los resultados corresponden a 4 experimentos \pm SEM.

4.5.2. Unión a neutrófilos porcinos

a) Localización inmunohistoquímica de galectina-1 y ligandos/receptores de galectina-1

Para determinar si la galectina-1 se expresa en la superficie de los PMN porcinos se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica sobre PMN adheridos a vidrio y fijados con formaldehído al 5%.

Se incubaron las improntas de PMN con antigalectina-1 de bazo porcino y con anticonejo-FITC como segundo anticuerpo y se observó fluorescencia en la membrana de los PMN, lo cual estaría indicando la presencia de galectina endógena sobre las mismas (Fig. 26 A y B). Para evaluar la posible presencia de ligandos/receptores de galectina-1 en PMN porcinos se incubaron las improntas de PMN con galectina-1 esplénica porcina, antigalectina-1 de bazo porcino y anticonejo-FITC como segundo anticuerpo. se observó un patrón diferente del anterior con una fluorescencia difusa y zonas de mayor intensidad en algunas regiones de la superficie de los PMN (Fig. 26 C y D). En los controles con PBS y suero de conejo preinmune no se observó fluorescencia (Fig. 26 E y F).

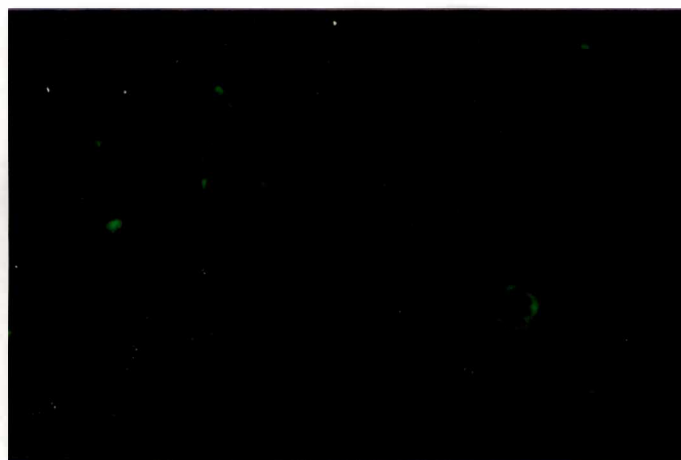
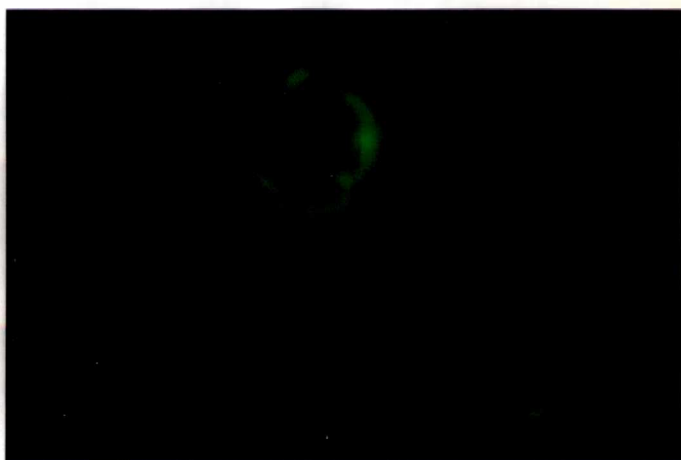
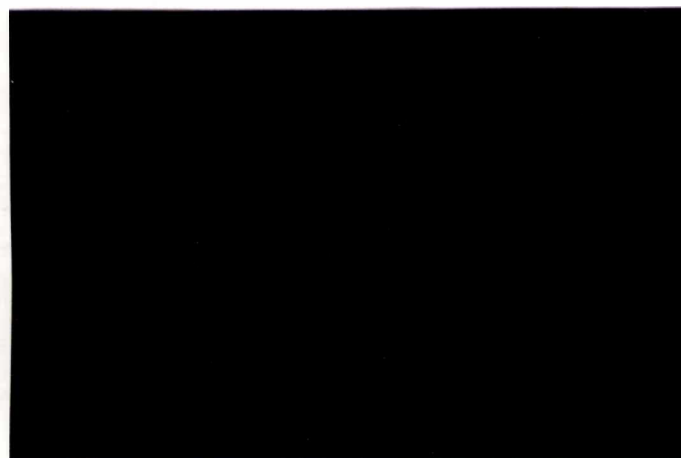
A)**B)****C)****D)****E)****F)**

Figura 26. Localización inmunohistoquímica de galectina-1 endógena y ligandos de galectina-1 en PMN porcinos incubados en diferentes condiciones. A) PMN con anticuerpo antigalectina-1 de bazo porcino (dilución = 1/100 en PBS con albúmina 5%) y luego con anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (dilución = 1/400). B) Detalle de la anterior. C) PMN con galectina-1 de bazo porcino (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), anticuerpo antigalectina-1 de bazo porcino (dilución = 1/100 en PBS con albúmina 5%) y luego con anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (dilución = 1/400). D) Detalle de la anterior. E) PMN con PBS y luego con anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (dilución = 1/400). F) PMN con suero preinmune y luego con anti-IgG de conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (dilución = 1/400). Aumento x 1000 (A, C y E).

4.6. Estudios preliminares de ligandos/receptores para galectina-1 en membranas de PMN humanos

La electroforesis del extracto de membranas de PMN humanos en SDS-PAGE 12% teñido con Coomassie mostró bandas de diferentes pesos moleculares (Fig. 27 A). Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa.

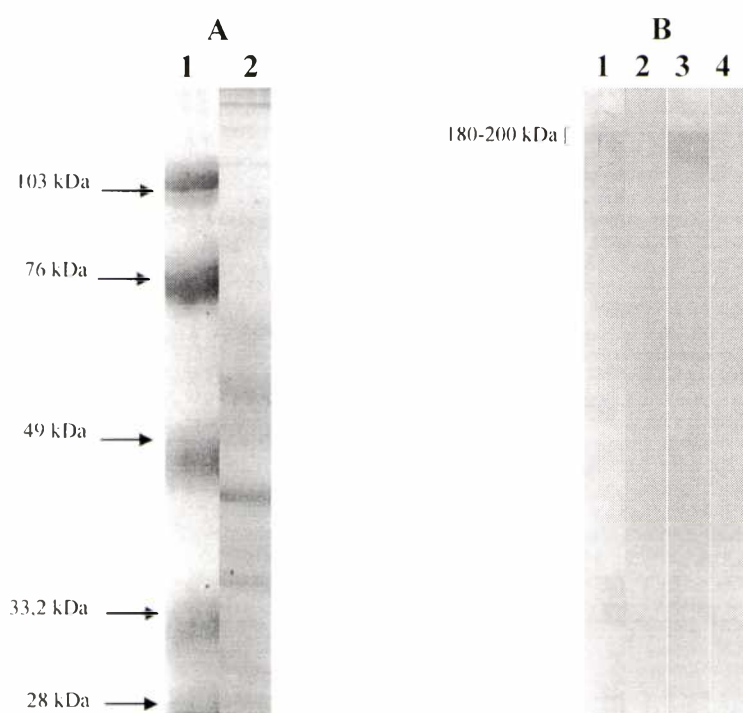


Figura 27. A) SDS-PAGE 12% en condiciones desnaturalizantes del extracto de proteínas de membranas teñidas con Coomassie: A1) estándar de PM; A2) proteínas de membranas de PMN humanos. B) *Immunoblotting* de los geles SDS-PAGE transferidos a nitrocelulosa incubados en diferentes condiciones: B1) galectina-1 de bazo porcino 10 μ g/ml y antigalectina-1 de bazo de cerdo (dilución 1/100) y anticuerpo anti-IgG conejo marcado con peroxidasa (segundo anticuerpo, dilución 1/400); B2) PBS, antigalectina-1 de bazo de cerdo, suero anticonejo marcado con peroxidasa (control negativo); B3) anti-CD45 (dilución 1/50) y antirratón marcado con peroxidasa (dilución= 1/250); B4) PBS y antirratón marcado con peroxidasa (dilución=1/250) (control negativo). Los estándares de peso molecular utilizados están indicados con flechas.

En el *immunoblotting* frente al suero antigalectina de bazo porcino se observaron varias bandas en la región de PM entre 180 y 200 kDa, lo cual indica que los posibles

ligandos/receptores corresponden a proteínas que caen dentro de ese rango de PM (Fig. 27, B1 y B2). La incubación con anti-CD45 mostró bandas en ese mismo rango de PM (Fig. 27, B3 y B4).

5. Discusión

5.1 Purificación y caracterización bioquímica parcial de galectinas de bazo y neutrófilos porcinos

En el marco de proyectos previos referidos al estudio de galectina-1, en nuestro laboratorio se purificó y caracterizó parcialmente una galectina de bazo de cerdo. En la electroforesis en gel de poliacrilamida se obtuvieron dos bandas una a 14 kDa y otra a 32 kDa, lo que indica probablemente que se trata de un homodímero con dos subunidades de peso molecular aproximado de 14 kDa. Como antecedente previo, en un estudio parcial Allen et al. (1987) purificaron una lectina de bazo porcino. En este trabajo de tesis se demuestra que dicha galectina es del tipo 1. Un aspecto interesante de la elección de este material de estudio es que, a diferencia de otras especies, no presentó numerosas bandas en el eluato de afinidad, lo cual simplificó la resolución de la hipótesis de trabajo.

La especificidad β -D-galactosídica se asemeja a las de otras galectinas-1. Los inhibidores más potentes fueron tiodigalactósido, lactulosa, N-acetil-lactosamina, p-nitrofenil-lactosa y lactosa, lo cual indica que como miembro de la familia de las galectinas tiene un sitio de reconocimiento de carbohidratos que une disacáridos. Los disacáridos con sustituciones en Glc o GlcNAc son mejores inhibidores que Gal libre, como en otras galectinas-1.

Por estudios inmunológicos (*immunoblotting*) de la galectina-1 con antisuero antigalectina-1 de bazo porcino obtenido en conejo, se confirmó la presencia de una banda. Además, los experimentos de reactividad cruzada también por *immunoblotting* mostraron que la galectina-1 de bazo porcino comparte epitopes con otras galectinas-1 relacionadas de bazo humano y cerebro humano. En relación a otras lectinas β -

galactosídicas en porcino, Chiu et al. (1994) identificaron una proteína de 37 kDa en células basales de epitelio de lengua de porcino que une una glicoproteína de 120 kDa y es inhibible por lactosa. Dicha proteína tiene una homología de aminoácidos del 72% con L-36, una lectina de función desconocida aislada de intestino de rata indicando que la proteína 37 kDa es la forma porcina de L-36.

La secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos por clivaje enzimático y separación por HPLC demostró que la lectina tiene el sitio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de tipo I, la identidad con galectina-1 ovina fue de 98%, con bovina 95%, humana 93%, rata 88% y ratón 83% y la molécula pudo ser clasificada como galectina-1. Merkle et al. (1989) obtuvieron la secuencia primaria de cuatro fragmentos tripticos (52 aminoácidos en total) de galectina-1 de corazón porcino y observaron que tenía gran homología con otras lectinas de vertebrados. También se secuenciaron galectinas-2 y -3 de intestino delgado porcino (Wintero et al., 1996).

En relación a la galectina en PMN porcinos, fue hallada en la fracción citosólica que se une a lactosa-agarosa y es específicamente eluida por lactosa. En la electroforesis en SDS-PAGE y con tinción argéntica se detectaron dos bandas de peso molecular aproximado de 14 kDa y 30 kDa que podrían representar galectina-1 y el dímero de las subunidades 14 kDa de galectina-1 por formación de puentes disulfuro. En experimentos de *immunoblotting* encontramos reactividad cruzada de la galectina de PMN con suero antiglectina-1 de bazo de cerdo. Por otra parte y contrapuesto a nuestros datos, La et al. (2003) no detectaron galectina-1 en neutrófilos humanos en reposo. Otros autores describieron la presencia de otras galectinas β -galactosídicas en neutrófilos humanos (Truong et al., 1993b).

En porcinos, Keresztes et al. (1997) identificaron dos proteínas del tipo de las galectinas que unen laminina (rica en polilactosamina) en la membrana celular de PMN con PM aparente de 50 kDa y 18 kDa; están involucradas en la unión de laminina a F-actina y recuerda la proteína p50-p52 LSP1 involucrada en la regulación de la estructura del citoesqueleto. En el PMN adherido al plástico, la proteína 18 kDa aumenta en la superficie celular mientras que la 50 kDa aumenta en la fracción de membrana más densa probablemente intracelular; o sea que estas glicoproteínas funcionan como lectinas y tienen un rol en la adhesión célula-sustrato. La 50 kDa es probablemente el CD14 que es una proteína-GPI anclada en membrana, característica de las células mieloides maduras (monocitos, macrófagos y granulocitos) y que es el receptor de lipopolisacáridos (LPS) presente en la membrana de bacterias Gram negativas. La identidad de la proteína 18kD no se ha dilucidado aún.

La caracterización parcial de la galectina de PMN indica que tiene, al menos en la porción secuenciada (29-48), homología con la galectina-1 obtenida de bazo porcino.

En otros estudios llevados a cabo en forma paralela a los de esta tesis, se determinaron las constantes de disociación de la galectina-1 esplénica porcina con sus ligandos por emisión de fluorescencia de triptofano con tiodigalactosido, lactulosa y lactosa, que fueron: K_D 0.09 ± 0.01, 0.20 ± 0.02 y 0.37 ± 0.03 mM, correspondientes a un cambio en energía libre de ΔG de 23.2, 21.1 y 19.6 kJ/mol, respectivamente. También se determinó la estabilidad conformacional de esta galectina y sus complejos con disacáridos en presencia de agentes desnaturalizantes por determinaciones de espectroscopía de dicroísmo circular aún a concentraciones de guanidina 6M; se

conserva la estructura de plegamiento- β , la molécula es aún compacta como se demuestra por cromatografía de exclusión y la desnaturalización es reversible. Esto se corresponde con un modelo *molten globule state*. Los datos muestran que el desdoblamiento de la molécula en ausencia del ligando es bifásico, demostrando la existencia de al menos un intermediario estable que conserva el sitio de unión del carbohidrato intacto. El complejo con el disacárido requiere concentraciones más altas de desnaturalizante que la galectina-1 sola, o sea que es más estable frente al desnaturalizante (Iglesias et al., 2003). Aunque éstas no son las condiciones fisiológicas, se podría pensar en un modelo con un intermediario desplegado y estable para explicar el pasaje de la galectina-1 a través de la membrana hacia la matriz extracelular.

5.2 Efecto de la galectina esplénica porcina sobre neutrófilos homólogos

5.2.1 Producción de superóxidos

En nuestro laboratorio comparamos la activación de la NADPH-oxidasa de PMN porcinos con diferentes estimuladores solubles fMLP, PMA, aglutinina *Viscum album* y galectina-1 de bazo porcino. fMLP y PMA fueron activadores más potentes que la galectina-1 en bajas concentraciones en presencia de citochalcina B. La estimulación con altas dosis (10 μ M) activó los PMN de manera significativa y la producción aumentó 845% con respecto a 2,5 μ M.

Además, se demostró que la estimulación de PMN porcinos por galectina-1 en presencia de CB depende, al menos parcialmente, del sitio de reconocimiento de carbohidratos

porque en presencia de lactosa la actividad estimulada con galectina-1 10 μM , se inhibió en 78%.

La activación de PMN para producir O_2^- a través de interacciones proteína-carbohidrato fue demostrada previamente para algunas lectinas vegetales. Con-A, una lectina que une manosa, induce la liberación de O_2^- (Zabucchi et al., 1981; Cohen et al., 1982) y H_2O_2 (Hamrell et al., 1979). Timoshenko y Gabius (1993) compararon la capacidad de diferentes lectinas de afectar la producción de O_2^- por neutrófilos humanos; la lectina β -galactosídica de *Viscum album* y Con-A son los inductores más potentes, seguidos por la lectina de *Ricinus communis* y aglutinina de germen de trigo. Con galectina-1 de placenta humana que induce la liberación de superóxidos en pacientes de ciertos tumores y con aglutinina lactosa específica de *Erythrina cristagalli*, se obtenía una respuesta menor (Timoshenko et al., 1993). Se han informado otras lectinas galactosa-específicas como estimuladoras del estallido respiratorio: la lectina de hemolinfa de *Halocynthia roretzi* (Yokosawa et al., 1986) y la lectina tipo 2 fimbrial de *Actinomyces viscosus* T14 (Sandberg et al., 1988). En un estudio realizado por Almkvist et al. (2002) comprobaron que la galectina-1 humana recombinante activa la NADPH-oxidasa en PMN humanos y que hay receptores localizados en los gránulos que se expresan en la superficie, luego del pretratamiento por extravasación de PMN *in vivo*, en sitios inflamatorios asépticos, o *in vitro* con estimulación con fMLP (10^{-7} M) que moviliza gránulos de gelatinasa y vesículas secretoras, sin disparar el estallido respiratorio. La galectina-3 (Karlsson et al., 1998) también activa NADPH-oxidasa en exudados, pero no en PMN de sangre periférica, empleando un receptor y curvas de dosis-respuesta diferentes. Previamente se había demostrado que la galectina-1 de bazo humano induce la formación de superóxidos en PMN homólogos en presencia de citochalasin B (Elola

y Fink, 2000b). Nishi et al. (2003) encontraron que la galectina-8 humana también activa la producción de superóxidos.

Así, la asociación de ciertos glicoligandos superficiales con lectinas pueden dar señales posreceptor que dependen de la especificidad de carbohidratos de la unión y de otros factores como el número o la localización espacial de los receptores y la movilidad de los complejos lectina-ligando (Timoshenko y Gabius, 1993).

Dado que nuestros resultados muestran que se necesitan altas concentraciones de galectina-1 de cerdo para activar los PMN homólogos, surge la pregunta de si esas concentraciones se alcanzan fisiológicamente. Las concentraciones que se usaron en nuestro laboratorio para producir O_2^- son mayores que los niveles de galectina-3 empleadas para activar mastocitos humanos (3 μ M, Frigeri et al., 1993), neutrófilos (Yamaoka et al., 1995) y monocitos (Liu et al., 1995). Almkvist y Karlsson (2004) encontraron que con galectina-1 a una concentración de 640 μ g/ml aún no se alcanza el máximo de la activación de NADPH-oxidasa, mientras que con galectina-3 se alcanza el máximo de activación a 40 μ g/ml. De todos modos, con ciertos estímulos o por injuria tisular puede haber un aumento de la secreción de galectina citosólica que aumente transitoriamente la concentración de lectina localmente (Yamaoka et al., 1995). En otras células también está documentado que se producen concentraciones importantes de galectinas. En monocitos humanos se observa un aumento de galectina-3 luego de la estimulación con el ionóforo de calcio A23187 (Liu et al., 1995). Concentraciones de 100 μ g/ml de galectina-3 se encuentran en el líquido de lavado broncoalveolar en ratones con inflamación inducida por ventilación (Liu et al., 1995). Para inducir apoptosis en células linfoblásticas MOLT-4 se necesita una concentración 10 μ M y

dicho efecto se revirtió por el agregado de lactosa hasta 10 minutos después de la exposición a galectina-1 (Perillo et al., 1995).

Aunque la concentración de galectina local en condiciones fisiológicas alcance niveles adecuados para la estimulación de los PMN, la galectina-1 esplénica porcina es un inductor débil de la producción de superóxidos.

Otro aspecto controversial está relacionado con efectos adicionales provocados por los estimuladores empleados. En un estudio realizado por Suzuki et al. (1998) se observó que los PMN de sangre periférica de cerdo aislados en un medio libre de suero (ausencia de activadores) sufren apoptosis en 1-2 días y estimulados con PMA (100 ng/ml) sufren cambios degenerativos en la morfología y muerte celular en 3-5 horas, aunque sin fragmentación de ADN, o sea que aparecen cambios necróticos pues las células no pudieron excluir el azul tripan. Necrosis y apoptosis son dos procesos que presentan características bioquímicas y metabólicas diferentes: por ejemplo la necrosis es reversible antes del punto de no retorno y el daño del ADN es difuso y al azar; el núcleo sufre cariólisis y no cariorrexis como en apoptosis; el mecanismo por el que se producen los cambios también es diferente. En necrosis hay depleción de ATP, injuria de membrana y formación de radicales libres (Spinelli et al., 1996). En nuestro trabajo, las estimulaciones con PMA fueron realizadas en tiempos menores a los 30 minutos y esto fue coincidente con la ausencia de alteraciones morfológicas visibles en las células empleadas.

Como se describió en la Introducción, durante el proceso de extravasación los PMN están expuestos a mediadores inflamatorios como interleuquinas, factores del

complemento y mediadores lipídicos que inducen actividades celulares como adhesión, diapédesis y quimiotaxis, así como la respuesta oxidativa a los estímulos. Ese aumento de la actividad celular se conoce como preestimulación y están involucrados el calcio, la fosforilación de proteínas y la movilización de gránulos que exponen receptores. Este último efecto es el más importante en la preestimulación de respuestas inducidas por galectina-1 en PMN humanos (Almkvist et al., 2002).

En relación a los experimentos con estimulación previa de PMN, éstos producen más superóxido y H_2O_2 que los no estimulados previamente frente a un estímulo como el fMLP. Se ha descrito la activación sinérgica de producción de anión superóxido por lectinas con diferente especificidad glucídica, Con-A y *Viscum album* (VAA) en presencia de dihidrocitochalasina B. Tratamientos con VAA (30 $\mu g/ml$) o Con-A (100 $\mu g/ml$) más dihidrocitochalasina B, induce la generación de poco O_2^- ; pero si se tratan primero los PMN con Con-A y luego con lectina de germen de trigo se observa un aumento del efecto estimulador del orden de 576% (Timoshenko y Gabius, 1993).

Almkvist et al. (2001) demostraron que galectina-3 es un potente activador, es un agonista de neutrófilos preestimulados con LPS, pero no de las células de sangre periférica no estimuladas previamente; el evento más importante que se produce por activación de PMN con LPS es la fusión de gránulos (preferentemente los de gelatinasa) con la membrana plasmática, lo cual expone receptores para galectina-3 y de fMLP. Es más fácil y rápido activar neutrófilos con galectina-1 que con galectina-3, los receptores para galectina-1 parecen estar localizados en vesículas secretoras y en gránulos de gelatinasa que son más fácilmente movilizables. La hipótesis de Almkvist y Karlsson (2004) es que la regulación de la exposición de receptores es de crucial importancia para

modular la respuesta del neutrófilo. En estudios de PMN por citometría y por técnicas de inmunohistoquímica, se observó la presencia de galectina-1 en la superficie de los PMN no estimulados, indicando que probablemente se encuentre unida a ligandos/receptores ya presentes en la membrana.

En nuestros experimentos, la preestimulación de PMN porcinos con galectina-1 de bazo de cerdo, seguida por estimulación con diferentes concentraciones de PMA, no produjo diferencias significativas con respecto a los PMN controles. De cualquier manera sería necesario experimentar con otra combinación de estímulos (LPS u otros) para dilucidar si el *priming* produce movilización de gránulos como en el caso de galectina-3 y fMLP (Almkvist et al., 2001). La galectina-1 recombinante humana (160 µg/ml) produjo un aumento de la producción de superóxido extracelular en PMN humanos pretratados con fMLP (10^{-7} M) a 15°C y luego 15 minutos a 37°C (Almkvist et al., 2002). Otros autores encontraron que en PMN porcinos el PMA actúa sinérgicamente con otros activadores que no son del tipo del PMA, como palitoxina, aumentando la producción de superóxidos y sugiriendo que estos compuestos activan diferentes señales en la célula (Kano et al., 1987).

Con el objeto de discriminar si el superóxido es producido por NADPH-oxidasa o por otras vías metabólicas, se probó inactivar la NADPH-oxidasa de PMN porcinos intactos con un calentamiento controlado a 46°C durante 0-10 minutos. Erikson et al. (1992) demostraron que un calentamiento suave de PMN humanos inactivaba el estallido respiratorio a través de un mecanismo que involucra la p67^{phox} que es termolábil; en el experimento también utilizaron las fracciones citosólicas p47 y p67^{phox} recombinantes purificadas para reconstituir la actividad del citosol normal precalentado. En nuestra

experiencia, la NADPH-oxidasa de PMN porcinos intactos tuvo una termolabilidad máxima a los 10 minutos de incubación controlada y a los 7.5 minutos se bloqueó casi totalmente la producción de superóxidos. El tratamiento con galectina-1 (hasta 10 μ M) de los PMN porcinos inactivados no produjo superóxidos en cantidad significativa lo que podría sugerir que la inducción de la producción de superóxidos por galectina-1 involucra la activación de NADPH-oxidasa. Hay una actividad residual del 14% que podría estar ligada a la NADPH-oxidasa de membrana que no se inactiva por calor (Erikson et al., 1992).

Otro aspecto de interés es la liberación de ácido araquidónico (AA) a partir de fosfolípidos de membrana, como uno de los primeros eventos que sigue a la estimulación de las células fagocíticas con una variedad de estimuladores como PLA₂, LPS y A23187 y es el paso limitante en la generación de mediadores lipídicos de la inflamación. Rabinovich et al. (2000) demostraron que la Gal-1 de hígado de pollo disminuye la producción de PGE₂ que se origina en AA en forma dosis dependiente, cuando las células son expuestas a estimuladores en presencia de Gal-1. Dias-Baruffi M et al. (2003) demostraron que la unión de galectina-1 dimérica (20 μ M) a neutrófilos humanos activados con fMLP (1 μ M), pero no en neutrófilos en reposo, puede inducir la exposición de fosfatidilserina (PS), aunque los cambios no están asociados con la destrucción de la membrana de los mismos. La interacción de PS con el receptor de PS en macrófagos tisulares puede promover la homeostasis por fagocitosis de células vivas y consecuentemente la modulación de la inflamación y de la respuesta inmune. Así, la Gal-1 aparece como un modulador de la inflamación aguda. Esto indica que estaría actuando de dos maneras diferentes y contrapuestas, por un lado modulando la respuesta inflamatoria y por otro lado activando la producción de superóxidos según nuestros

resultados y los de otros autores. Así, del balance de este efecto dual se produciría una resolución o no del proceso inflamatorio.

5.2.2 Liberación de lisozima (degranulación)

Además del estallido respiratorio, la actividad microbicida se ejerce a través de la degranulación que representa el proceso de fusión de los gránulos presentes en el citoplasma del PMN con el fagosoma. En los gránulos hay enzimas como la elastasa, mieloperoxidasa y lisozima. Se han realizado diferentes estudios sobre liberación de lisozima frente a diferentes estímulos en presencia de citochalasina B. Se observó la liberación de lisozima en PMN tratados con citochalasina B estimulados con Con-A que se bloqueó específicamente por α -metil-D-mannosido (Goldstein et al., 1977). Los PMN tratados con GM-CSF o los PMN controles sólo se degranularon en presencia de CB y *Candida albicans*; no se observó liberación de lisozima cuando no eran tratados con CB o si eran tratados con GM-CSF o G-CSF sin el estímulo adicional de *Candida* opsonizada (Kletter et al., 1989). La galectina de pollo 16 kDa produjo una liberación significativa de lisozima de PMN humanos en presencia de CB (Timoshenko et al., 1995a, 1997). En nuestra experiencia también se demostró la liberación de lisozima de PMN porcinos pretratados con CB y estimulados con fMLP o galectina-1 de bazo porcino. La incubación previa de galectina-1 10 μ M con lactosa 100 mM produjo una inhibición parcial de la liberación de lisozima (aproximadamente 50%), lo que indicaría que al menos en parte, el sitio de reconocimiento de carbohidratos está involucrado en el proceso de degranulación.

Esta inhibición parcial que ocurre también en la producción de superóxidos podría estar relacionada con lo que ocurre *in vivo*, una explicación posible estaría dada por la hipótesis de Fred Brewer et al. (2002) que propusieron un modelo de interacciones multivalentes proteína-carbohidrato que involucra el ensamblaje termodinámicamente favorable de arreglos ordenados de lectinas y azúcares, en dominios discretos sobre la superficie celular, lo que conduce a diversos eventos celulares como proliferación, adhesión u otros. Fisiológicamente una célula puede estar cubierta por lectinas endógenas unidas a azúcares creando una asociación local de glicoproteínas y glicolípidos específicos en la membrana.

En porcinos así como en otros animales domésticos (bovinos, oveja y búfalo) se observa que la cantidad de lisozima en células de sangre periférica es muy variable (Andonova et al., 2001). En cerdos recién nacidos se observaron niveles inferiores de lisozima luego de la estimulación de los PMN con zymosan con respecto a las madres ($0,46 \pm 0,11$ contra $0,80 \mu\text{g/ml}$) y en cerdos de 60-120 días se obtuvieron valores inferiores en aquéllos criados en condiciones libre de gérmenes con respecto a los normales (Ferencik et al., 1985). También otros autores (du Manoir et al., 2002) encontraron variabilidad entre días y entre individuos en cuanto a las funciones de neutrófilos y macrófagos alveolares (fagocitosis, estallido respiratorio y degranulación).

Otro dato interesante es que en porcinos, la secreción mamaria tiene sustancias antimicrobianas como lactoferina, lisozima, lactoperoxidasa, citoquinas, complemento, lípidos, carbohidratos y macromoléculas de origen no inmune. La lisozima está presente también en otros tejidos y en células fagocíticas, aunque su rol en la secreción mamaria no es claro. Solamente algunas bacterias son susceptibles a la acción de la lisozima sola,

en general interacciona con complemento y anticuerpos para adquirir capacidad de matar a una gran variedad de bacterias Gram negativas. En porcinos, la IgA une complemento sólo en presencia de lisozima, adquiriendo así capacidad microbicida. La eliminación de la lisozima de la secreción mamaria reduce la actividad microbicida de la misma (Wagstrom et al., 2000).

De la misma manera que en la activación de NADPH-oxidasa, se encontró que fMLP y PMA son activadores de la degranulación más potentes que la galectina-1 porcina a bajas dosis. Altas concentraciones de galectina-1 porcina (10 μ M) más citochalasina B estimulan significativamente los PMN. Es probable que galectina-1 porcina pueda aumentar su respuesta *in vivo* en combinación con otros estimulantes. En cuanto a los efectos sinérgicos de galectina-1 de bazo porcino y PMA, se observó que la preestimulación de PMN con galectina-1 produjo un aumento no significativo de la liberación de lisozima con respecto a los controles.

Almkvist et al. (2002), confirmando nuestros datos previos en humanos, sugieren que galectina-1 produce la liberación de superóxidos en el espacio extracelular y también produce radicales activos del oxígeno intracelular que pueden tener efectos bactericidas, o sea que galectina-1 puede actuar como potenciador de la actividad bactericida en la célula. También la galectina-1 ha sido involucrada en apoptosis de células T (Perillo et al., 1995). Al contrario de galectina-3, la galectina-1 no tiene actividad quimiotáctica y se ha observado que inhibe la migración de eosinófilos en pólipos nasales sugiriendo que la unión con galectina-1 inhibe la migración de células inflamatorias (Almkvist y Karlsson, 2004). O sea que las diferentes galectinas de diferentes especies y tejidos

pueden ejercer funciones variadas, lo que indica que estas moléculas son estructuras conservadas que juegan importantes papeles en diversos procesos biológicos.

5.2.3. Fagocitosis

No tenemos referencias previas de estudios del efecto de galectina-1 sobre la fagocitosis de PMN. Nuestros resultados muestran que la galectina-1 esplénica porcina disminuye la AF de los PMN porcinos, a cualquier concentración, en forma no significativa ($p > 0.05$), pero produce una reducción significativa de AL ($p < 0.002$) y del IFL ($p < 0.04$) dosis dependiente. En los estudios de inhibición, se observó que la incubación previa de galectina-1 de bazo porcino con lactosa no produjo una inhibición significativa de AF, lo cual estaría indicando que en la unión de la galectina-1 pueden participar otros ligandos como uniones proteína-proteína.

Se han estudiado los efectos de las lectinas sobre la actividad fagocítica y bactericida de macrófagos peritoneales de ratón y se observa que dependen del tipo de lectina, algunas como la Con-A y la de *Phaseolus vulgaris* la activan a través de receptores que contienen GlcNAc y otras inhiben la actividad fagocítica de macrófagos como las de *Machaerocereus eruca* y *Amaranthus leucocarpus* que reconocen estructuras que contienen complejos de galactosa y N-acetil-D-galactosamina. Esto significa que los carbohidratos superficiales tienen un rol específico en la regulación de la actividad macrofágica (Maldonado et al., 1994).

En estudios *in vivo* realizados en cerdos luego de la inyección intravenosa de LPS de *Escherichia coli*, se observó que al cabo de una hora el porcentaje de PMN y de

monocitos disminuye (de 43,17% a 28,16% y de 2,17% a 0,33% respectivamente), pero la relación del número de bacterias fagocitadas/número de células fagocíticas no se modificaba significativamente en este período con un desvío a la izquierda marcado por el aumento de PMN en banda; a las dos a tres horas postratamiento se observó el aumento de la fagocitosis y la liberación de mediadores solubles como IL-1, TN- α , prostaglandinas, PAF y otros por los PMN estimulados por la endotoxina (Andonova M et al., 2001).

En nuestro laboratorio se observó que los PMN porcinos tienen una actividad fagocítica menor que los humanos, comparando con nuestras experiencias previas empleando el mismo test: AF=113,8 \pm 34 (\bar{x} \pm SEM) contra AF= 252,8 \pm 23,35 (\bar{x} \pm SEM) en ausencia de galectina-1 homóloga o 91,6 \pm 37 y 292,0 \pm 36,25 en presencia de galectina-1 en concentración 1 μ M para porcinos y humanos respectivamente (datos no publicados).

Los mecanismos líticos mieloperoxidasa independientes que son testeados por la lisis de Cp parecen estar afectados por la acción de galectina-1 de bazo porcino sobre PMN homólogos. Este mecanismo fue descrito por Lehrer (1972) y es activo en pacientes mieloperoxidasa deficientes o con enfermedad granulomatosa crónica. En cuanto a la relevancia en la patología porcina es un aspecto a dilucidar.

Los componentes más importantes de la membrana de las candidas son los mananos (polímeros de manosa en unión α), glicanos (polisacáridos de glucosa ramificados en unión β) y quitina (biopolímero semejante a celulosa consistente predominantemente de N-acetil-D-glucosamina). Los resultados obtenidos *in vitro* por Marodi et al. (1991) demuestran que la fagocitosis de candidas, no opsonizadas por los macrófagos murinos

y humanos, es mediada por la unión de los residuos de manosa de las cándidas a los receptores de manosa de los macrófagos y depende de la presencia de Ca^{2+} . Demostraron también que los mananos obtenidos de levaduras inhibían la fagocitosis de cándidas no opsonizadas, pero no influenciaban la fagocitosis de cándidas opsonizadas. Este puede ser un mecanismo de defensa contra las cándidas en el paciente inmunosuprimido. Además otros autores observaron que esa interacción cándida-macrófago a través de β -1,2oligomanósidos produce el corte de fosfolipomananos de las cándidas como una señal temprana en la transducción (Jouault et al., 1998). El receptor del macrófago fue identificado por Fradin et al. (2000) como una lectina endógena homóloga a galectina-3 (32 kDa), tiene diversas funciones y se expresa en diversos tipos celulares con los que puede interactuar *Candida albicans*. Esto aporta evidencias de que miembros de la familia de las galectinas participan del reconocimiento hapteno y ligando/receptor en diferentes células.

Así, el efecto antifúngico de linfocitos contra *Candida albicans* requiere primero la adhesión de los mismos a las hifas. Forsyth y Mathews (2002) identificaron a la integrina antígeno macrofágico-1 (Mac-1) (CD11b/CD18, α_M/β_2) presente en la superficie del linfocito (humano y murino) como la estructura responsable de la adhesión del linfocito activado a las hifas de *Candida albicans*. Además, esa unión era bloqueada por β -glicanos, N-acetil-D-glucosamina, anticuerpos anti-CD11b y anti-CD18, con proteínas de la matriz extracelular como laminina y proteínas fibronectin-símiles. En los PMN el CD11b/CD18, (α_M/β_2) es un receptor muy activo y también en esta célula podría ser un posible ligando de galectina-1.

La activación de los PMN con rIFN- γ (expone Fc γ RI que está involucrado en el reconocimiento de partículas opsonizadas) *in vitro* no afecta significativamente la velocidad de fagocitosis de *Candida albicans*, mientras que sí aumenta la producción de intermediarios reactivos del oxígeno como H₂O₂ y O₂⁻ que actúan como microbicidas frente a cándidas; la presencia de inhibidores de la NADPH-oxidasa como el difenileniodonio (DPI) inhibe la actividad microbicida sobre cándidas, indicando que los radicales de oxígeno están involucrados. Los granulocitos son las células fagocíticas más importantes en la defensa contra las infecciones por cándidas. No obstante cuando hay un gran número de cándidas en el sitio de infección, los hongos no son fácilmente destruidos. La activación de PMN por citoquinas como IFN- γ pueden acelerar este proceso (Stevenhagen et al., 1993). Nuestros datos con PMN estimulados con galectina-1 y luego desafiados con *Candida pseudotropicalis* indican que si bien la galectina-1 activa levemente los mecanismos de destrucción mieloperoxidasa dependientes, en la fagocitosis estaría actuando sobre mecanismos diferentes que inhiben la lisis de estas cándidas. Coincidentemente en estudios realizados por Riber et al. (1999) la preestimulación de neutrófilos porcinos con PMA produjo una disminución del estallido respiratorio inducido por salmonella opsonizada viva; en estos experimentos se observó que la actividad bactericida intracelular era variable entre los animales estudiados (n=3), en uno de los mismos se observó una pronunciada disminución de la actividad en los PMN preestimulados con PMA.

5.3 Unión de galectina-1 exógena de bazo porcino a neutrófilos y detección de galectina-1 endógena

Se realizaron diversos experimentos para detectar galectina-1 endógena y la presencia de ligandos para galectina-1 de bazo porcino en neutrófilos humanos y porcinos por agregación, citometría de flujo e inmunohistoquímica.

La agregación de PMN humanos por galectina-1 esplénica porcina parece guardar una relación dosis-respuesta significativa, según el coeficiente de correlación de Spearman ($p < 0.05$) en el rango de 0 a $1.7 \mu\text{M}$. Esto confirma la presencia de receptores para la galectina-1 porcina en la superficie del PMN humano. Recientemente y contradiciendo sus propios datos anteriores (Timoshenko et al., 1995b), Timoshenko et al. (2003) encontraron que galectina-1 bovina ($100 \mu\text{g/ml} = 3.3 \mu\text{M}$) es un agregante más potente de neutrófilos humanos que galectina-3 recombinante ($3.3 \mu\text{M}$) comparando con la agregación con VAA ($3 \mu\text{g/ml}$) como control y fue bloqueado por la adición de lactosa, o sea que la unión depende de la presencia de carbohidratos. De acuerdo con estos autores, la agregación de células puede llevar a la formación de contactos HSR (contactos intercelulares resistentes a azúcares) que desencadenan señales intracelulares. Así se ha visto que la galectina-3 no induce a su formación y los agregados celulares son sensibles a la presencia de lactosa; en cambio los agregados formados por galectina-1 resisten al bloqueo de los sitios de unión de la lectina por lactosa después de transcurrido un período de 3-5 minutos desde el inicio de la unión. Se determinó que 3-4 minutos era el tiempo mínimo para la formación de dichos contactos (el mismo tiempo de latencia se observó con VAA). En cuanto a los niveles de Ca^{++} intracelular, Timoshenko et al. (2003) observaron que galectina-1 lo eleva en células Jurkat T CD45^+ y en células MOLT 4, pero no en PMN humanos. Los mismos autores no encontraron

activación de la producción de superóxidos por NADPH-oxidasa en PMN de sangre periférica humana tratados con galectina-1 y -3, pero sí en PMN preestimulados con citochalasina B o LPS o en PMN de exudados que responden así al estímulo de galectina-3. En el proceso de *priming* se abren canales de Ca^{++} , se activan proteinquinasas y fosfolipasas o se aumenta la expresión de receptores de adhesión.

Nuestros resultados obtenidos por citometría de flujo indican que hay un aumento de la fluorescencia, expresado como porcentaje de células marcadas con respecto de los controles, cuando se incubaron PMN humanos con galectina-1 de bazo porcino. Se observó que dicha interacción no es dosis dependiente entre 0.001 y 20 μ M. La unión fue parcialmente inhibible por lactosa 100 mM en una concentración de 1 μ M (aproximadamente 50%) confirmando que la misma es carbohidrato dependiente. Se sabe que galectina-1 se une preferentemente a residuos de N-acetil-lactosamina de oligosacáridos asociados con diversos glicoconjugados de la superficie de la célula. En trabajos de otros autores se ha observado que galectina-1 reconoce glicoproteínas presentes en la membrana celular de linfocitos humanos Jurkat T, entre los que han sido identificados los antígenos CD2 y CD3 (Waltzel et al., 2000). Perillo et al. (1995) comprobaron que los linfocitos T activados y en reposo unen galectina-1 a través de secuencias de polilactosamina de los N- y O-glicanos de CD45. Posteriormente, Foullit et al. (2000) inhibieron la unión de galectina-1 con receptores de la membrana de células BL36, con anti-CD45 y con β -tiodigalactósido 50 mM.

Almkvist et al. (2002) comprobaron que FITC-galectina-1 recombinante humana se une a ligandos presentes en PMN humano preestimulados con fMLP (10^{-7}). CD66a y CD66b son receptores de galectina-3 en neutrófilos humanos y se encuentran almacenados en

gránulos intracelulares secundarios y terciarios. En tanto las glicoproteínas 1 y 2 asociadas a lisosomas (LAMP-1 y LAMP-2) ligan galectina-3, pero no funcionan como receptores de galectina-3 en la superficie del PMN ya que se encuentran en organelas que no son secretables aunque sí se las encuentra en el fagosoma (Feuk-Lagerstedt et al. 1999). Los datos obtenidos por nosotros en citometría de flujo indican que la preincubación de los PMN porcinos con PMA (10ng/ml) y fMLP (1 μ M) aumenta la exposición de ligandos para galectina-1 de bazo porcino.

Por técnicas de inmunofluorescencia aportamos otra evidencia sobre la presencia de ligandos para galectina-1 de bazo porcino en la superficie de PMN homólogos; además detectamos la presencia de galectina-1 endógena con antigalectina-1 de bazo de cerdo obtenida en conejo. Observamos fluorescencia en la membrana en forma difusa y en regiones localizadas de mayor intensidad de fluorescencia. Otros autores encontraron en mioblastos C2 de ratón galectina-1 en el citoplasma, pero no en el núcleo y más recientemente se ha visto por inmunofluorescencia en células de ovario de hamster que la galectina-1 está exclusivamente en el citoplasma (Liu et al., 2002). Akimoto et al. (1995), utilizando técnicas de inmunohisquímica, encontraron galectina-1 en la membrana celular de células basales y de la capa espinosa de epidermis en piel humana; también la encontraron en citoplasma y núcleo de células de Langerhans de la epidermis, mientras que en la dermis se detectó en la matriz extracelular y en núcleo y citoplasma de fibroblastos. Estos datos sugieren que la galectina reconoce glicoconjugados que contienen galactosa y lactosamina que se acumulan sobre la superficie de las células y que reconoce también otras moléculas como fibronectina presente en la dermis. Esta distribución de la galectina-1 en el citoplasma y membrana podría indicar un camino de secreción por alguno de los mecanismos propuestos para

galectina-1, que no es el clásico de otras proteínas secretoras, dado que carecen del péptido señal de secreción.

En relación con los procesos de secreción, se ha visto que los ionóforos de calcio y otros estímulos inducen un proceso que se conoce como ectocitosis, que es una microvesiculización y corte en una variedad de células sin causar lisis. El mecanismo común parece ser la extrusión del exceso de membrana de la superficie celular liberando vesículas extracelulares. El primer indicio del rol de la ectocitosis en la secreción de galectina-1 se obtuvo de los estudios inmunohistoquímicos de la fusión de mioblastos. Los mioblastos indiferenciados tienen galectina-1 distribuida difusamente en el citoplasma; sólo una pequeña fracción de la lectina se secreta y aparece en la superficie celular en las células migrantes específicamente en el frente. Luego de la fusión la lectina se redistribuye hacia el citosol por debajo de la membrana plasmática en regiones localizadas de la membrana plasmática y en porciones evaginadas de la misma, pero no se pudo describir la presencia de vesículas con lectina que sería un paso esencial de la ectocitosis (Hughes, 1999). Las células endoteliales humanas expresan galectina-1, aunque los niveles basales son bajos; la activación con lipopolisacáridos bacterianos y quimoquinas combinadas produce un aumento de la expresión (Almkvist y Karlsson, 2004).

5.4. Estudios preliminares de ligandos/receptores para galectina-1 en membranas de PMN humanos

Mediante estudios de *immunoblotting* de PMN porcinos se observó que galectina-1 esplénica porcina reconoce al igual que en células T varios ligandos presentes en la membrana del neutrófilo, coincidente con lo mencionado por otros autores (Almkvist y

Karlsson, 2004). Resulta dificultoso asignar un receptor específico. Los receptores para galectina-1 no están aún bien caracterizados; Avni et al. (1998) mostraron que galectina-1 coimmunoprecipita con CR3 (CD11b/CD18) en macrófagos de médula ósea murina, que la unión es inhibible por lactosa; las dos proteínas colocalizan por inmunofluorescencia. La unión de galectina-1 a CR3 podría modificar su actividad y modular la respuesta celular (Almkvist y Karlsson, 2004). Fajka-Boja et al. (2002) encontraron que CD45 no es la mayor proteína ligadora de galectina-1 en células T pues otras proteínas de PM 160, 134, 95 y 58 kDa se unen con intensidad similar.

Los ligandos N-acetil-lactosamina reconocidos por las galectinas se encuentran distribuidos en diversos N- y O-glicanos, pero las galectinas pueden discriminar entre diferentes glicoproteínas, lo que le confiere diferentes funciones en tipos celulares específicos. La galectina-1 inhibe la adhesión de linfocitos a integrinas influenciando así la adhesión celular mientras que galectina-3 antagoniza con la adhesión de células de cáncer de mama a integrinas. Actualmente se sabe que en muchos sistemas se requiere el agrupamiento de receptores y ligandos para transmitir señales, aunque todavía no se han esclarecido cuáles son los estímulos que lo producen (Fred Brewer et al., 2002).

Por otro lado, se ha postulado que la galectina-1 producida por las células endoteliales podría actuar inhibiendo el proceso de extravasación de los PMN de la sangre a través del endotelio de los capilares. Los sitios de unión de galectina-1 en PMN y células endoteliales son modulados por mediadores proinflamatorios entonces la galectina podría jugar un rol importante disminuyendo la reacción inflamatoria (fase de resolución) (La et al., 2003).

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan evidencias sobre la presencia de galectina-1 en bazo y PMN porcinos y de sus ligandos leucocitarios. Además se demuestra la actividad de galectina-1 como modulador de las funciones de PMN porcinos. Proponemos que las concentraciones locales de galectina-1 en PMN en el sitio de inflamación puedan alcanzar niveles razonables, de manera que pueda actuar sola o sinérgicamente como inductor natural de la producción de superóxido y en la degranulación, participando en la defensa contra las infecciones bacterianas.

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones

- Se purificó y caracterizó parcialmente una galectina de bazo de cerdo, cuyo peso molecular aproximado es de 14 kDa, que comparte epitopes con otras galectinas-1 relacionadas como la de bazo humano y cerebro humano. Su sitio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) es de tipo 1 y la especificidad β -D-galactosídica se asemeja a las de otras galectinas-1. Así, la molécula pudo ser clasificada como galectina-1.
- La galectina de PMN de cerdo purificada tiene un peso molecular aproximado de 14 kDa y comparte epitopes con galectinas-1 de bazo porcino.
- Nuestros datos indican que la galectina-1 porcina en combinación con otros estimuladores pueden influir en la respuesta que involucra a las células fagocíticas, reclutadas en el sitio de inflamación, induciendo la producción de superóxidos por activación de la NADPH-oxidasa y la liberación de enzimas por degranulación.
- En cuanto a la fagocitosis, nuestros resultados muestran por primera vez, que la galectina-1 esplénica porcina disminuye la actividad fagocítica de los PMN porcinos a cualquier concentración y produce una reducción significativa de actividad lítica inhibible parcialmente por lactosa. Los PMN porcinos tienen una actividad fagocítica menor que los humanos. Parecen estar afectados los mecanismos líticos mieloperoxidasa independientes.

- Se observó la presencia de ligandos/receptores para galectina-1 exógena de bazo porcino en PMN humanos y porcinos; esa unión es parcialmente inhibible por lactosa lo que indica que la unión es carbohidrato dependiente.

- En PMN porcinos encontramos galectina-1 endógena distribuida difusamente en la membrana, lo que podría estar indicando que la misma se une a glicoconjugados presentes en la membrana.

- La interacción galectina-1-PMN puede modular, a través de esa unión, funciones como el estallido respiratorio y la degranulación e influir en la respuesta inflamatoria.

7. Bibliografía

- Abbott WM, Feizi T. Evidence that the 14 kDa soluble β -galactoside-binding lectin in man is encoded by a single gene. *Biochem J* 259:291-4, 1989.
- Ahmed H, Vasta GR. Galectins: conservation of functionally and structurally relevant amino acid residues defines two types of carbohydrate recognition domains. *Glycobiology* 4:545-9, 1994.
- Ahmed H, Allen HJ, Sharma A, Matta KL. Human splenic galactin: carbohydrate-binding specificity and characterization of the combining site. *Biochemistry* 29: 5315-9, 1990.
- Ahmed H, Fink NE, Vasta GR. A novel solid-phase assay for lectin binding: comparative studies on β -galactoside binding S-type lectins from fish, amphibian, and mammalian tissues. *Ann NY Acad Sci*; 712:315-7, 1994.
- Ahmed H, Pohl J, Fink NE, Strobel F, Vasta GR. The primary structure and carbohydrate specificity of a β -galactosyl-binding lectin from toad (*Bufo arenarum* Hensel) ovary reveal closer similarities to the mammalian galectin-1 than to the galectin from the clawed frog *Xenopus laevis*. *J Biol Chem*; 271:33083-94, 1996.
- Akimoto Y, Hirabayashi J, Kasai K, Hirano H. Expression of the endogenous 14-kDa beta-galactoside-binding lectin galectin in normal human skin. *Cell Tissue Res*; 280:1-10, 1995.
- Allen HJ, Cywinski M, Palmberg R, DiCioccio RA. Comparative analysis of galactoside-binding lectins isolated from mammalian spleens. *Arch Biochem Biophys*; 256:523-33, 1987.
- Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconjugate J*; 19:575-81, 2004.
- Almkvist J, Faldt J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Lipopolysaccharide-induced gelatinase granule mobilization primes neutrophils for activation by galectin-3 and formylmethionyl-leu-phe. *Infect Immun*; 69:832-7, 2001.
- Almkvist J, Dahlgren C, Leffler H, Karlsson A. Activation of the neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase by galectin-1. *J Immunol*; 168: 4034-41, 2002.
- Andonova M, Borissov I, Sotirov L. Changes in some factors of the innate immunity and serum zinc and iron concentrations in pigs following intravenous administration of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Onderstepoort J Vet Res*; 68:91-9, 2001.
- Astarie-Dequeker C, Nigou J, Puzo G, Maridonneau-Parini I. Lipoarabinomannans activate the protein Tyrosine kinase Hck in human neutrophils. *Infect Immun*; 68:4827-30, 2000.

- Avni O, Pur Z, Yefenof E, Baniyash M. Complement receptor 3 of macrophages is associated with galectin-1-like protein. *J Immunol*; 160:6151-8 .1998.
- Babior BM. The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease. *Am J Hematol*; 37:263-6, 1991.
- Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-76, 1999.
- Babior BM, Golde DW. Production, distribution and fate of neutrophils. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams' hematology*. 6 ed. New York: McGraw- Hill, 2001; Cap. 66:753-9.
- Barnes CR, Mandell GL Carper HT, Luong S, Sullivan GW. Adenosine modulation of tumor necrosis factor- α -induced neutrophil activation. *Biochem Pharmacol*; 50:1851-7, 1995.
- Barondes SH. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science*; 223:1259-64, 1984.
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DNW, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, et al. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *Cell*; 76:597-8, 1994a.
- Barondes SH, Cooper DNW, Gitt MA, Leffler H. Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*; 269:20807-10, 1994b.
- Beutler E. Composition and metabolism of neutrophils. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams' hematology*. 6 ed. New York: McGraw- Hill, 2001; Cap. 65:745-52.
- Blum H, Beier H, Gross HJ : Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99, 1987.
- Borregaard N, Lollike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Basthloem L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol*; 51:187-98. 1993
- Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*; 89:3503-21, 1997.
- Bourne Y, Bolgiano B, Nésa MP, Penfold P, Johnson D, Feizi, Cambillau C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the soluble 14 kDa β -galactoside binding lectin from bovine heart. *J Mol Biol*; 235:787-9, 1994.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood: isolation of mononuclear cells by centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1x g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*; 97:77-89, 1968.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*; 72:248-54, 1976.
- Cao Z, Said N, Amin S, Wu HK, Bruce A, Garate M. Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelization of wounds. *J Biol Chem*; 277:42299-305, 2002.
- Cardinali A, Etchevez P, Pizzimenti MC, Griemberg G. Preparación de improntas para la detección de anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos evaluación de un método alternativo. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 28:561-6, 1994.
- Cerra RF, Gitt MA, Barondes S H. Three soluble rat β -galactoside-binding-lectins. *J Biol Chem*; 260:10474-7, 1985.
- Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S. The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J Exp Med*; 170: 1959-72, 1989.
- Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S. Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:7324-8, 1990.
- Chiu ML, Parry DA, Feldman SR, Klapper DG, O'Keefe EJ. An adherence junction protein is a member of the family of lactose-binding lectins. *J Biol Chem*; 269:31770-6, 1994.
- Clark RA, Volpp BD, Leidal KG, Nauseef WM. Two components of the human neutrophil respiratory burst oxidase translocate to the plasma membrane during cell activation. *J Clin Invest*; 85:714-21, 1990.
- Clerch LB, Whitney P, Hass M, Brew K, Miller T, Werner R, et al. Sequence of a full-length cDNA for rat lung β -galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*; 27:692-9, 1988.
- Cohen MS, Metcalf JA, Root RK. Regulation of oxygen metabolism in human granulocytes: relationship between stimulus binding and oxidative response using plant lectins as probes. *Blood* 55, 1003-1010. (1980)
- Combadiere C, Hakim J, Giroud JP, Perianin A. Staurosporine: a protein kinase inhibitor, up-regulates the stimulation of human neutrophil respiratory burst by N-formil peptides and platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun*; 168:65-70, 1990.
- Cooper DNW, Barondes S H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*; 110:1681-91, 1990.
- Cooper DNW, Massa SM, Barondes SH. Endogenous muscle lectin inhibits myoblasts adhesion to laminin. *J Cell Biol*; 115:1437-48, 1991.

- Couraud PO, Casentini-Borocz D, Bringman TS, Griffith J, McGrogan M, Nedwin GE. Molecular cloning, characterization, and expression of a human 14-kDa lectin. *J Biol Chem*; 264:1310-6, 1989.
- Cross AR, Curnutte JT. The cytosolic activation factors p47^{phox} and p67^{phox} have distinct roles in the regulation of electron flow in NADPH oxidase. *J Biol Chem*; 270:6543-8, 1995.
- Curnutte JT, Kipnes RS, Babior BM. Defect in pyridine nucleotide dependent superoxide production by a particulate fraction from the granulocytes of patients with chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*; 293:628-32, 1975.
- Curnutte JT, Kuver R, Babior BM. Activation of the respiratory burst oxidase in fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem*; 262:6450-2, 1987.
- Curnutte JT, Scott PJ, Mayo LA. Cytosolic components of the respiratory burst oxidase; resolution of four cytosolic components, two of which are missing in complementing types of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci USA*; 86:825-9, 1989.
- Curnutte JT, Orkin S, Dinauer M. Genetic disorders of phagocyte function. En: Stamatoyanopoulos G, editor. *The molecular basis of blood diseases*. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994:493.
- Dahlgren C, Sunqvist T. Phagocytosis and hydrophobicity: a method of calculating contact angles based on the diameter of sessile drops. *J Immunol Methods*; 40:171-9, 1981.
- Derian CK, Solomon HF, Higgins JD, Beblavy MJ, Santulli RJ, Bridger GJ. Selective inhibition of N-formylpeptide-induced neutrophil activation by carbamate-modified peptide analogues. *Biochemistry* 35:1265-9, 1996.
- Dias-Baruffi M, Zhu H, Choi M, Karmakar S, McEver RP, Cummings RD. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis *J Biol Chem*; 278:41282-93, 2003.
- Dinauer MC. The phagocyte system and disorders of granulopoiesis and granulocyte function. En: Nathan DG, Orki SH, editors. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. Cap. 22:889-949.
- DiNubile MJ, Cassimeris L, Joyce M and Zigmond SH. Actin filament barbed-end capping activity in neutrophil lysates: The role of capping protein- β_2 . *Mol Biol Cell*; 6:1659-71, 1995.
- Do KY, Smith DF, Cummings RD. LAMP-1 in CHO cells is a primary carrier of poly-N-acetylglucosamine chains and is bound preferentially by a mammalian S-type lectin. *Biochem Biophys Res Commun*; 173:1123-8, 1990.

- Drickamer K. Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. *Curr Opin Struct Biol*; 3:393-400, 1993.
- Du Manoir JM, Albright BN, Stevenson G, Thompson SH, Mitchell GB, Clark ME et al. Variability of neutrophil and pulmonary alveolar macrophage function in swine. *Vet Immunol Immunopathol* 80:175-86, 2002.
- Dunphy JL, Balic A, Barcham GJ, Horvath AJ, Nash AD, Meeusen EN. Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin. *J Biol Chem*; 275:32106-13, 2000.
- Dunphy JL, Barcham GJ, Bischof RJ, Young AR, Nash A, Meeusen EN. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J Biol Chem*; 277:14916-24, 2002.
- Dyer K, Hansen JS, Rosenberg HF. The genomic structure of the human Charcot-Leyden crystal protein gene is analogous to those of the galectin genes. *Genomics*; 40:217-21, 1997.
- Ellison RT, Giehl TJ. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest*; 88:1080-91, 1991.
- Elola MT. Detección, cuantificación y caracterización de lectinas β-galactosídicas de *Bufo arenarum*. [Doctoral dissertation]. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata, 1996.
- Elola MT, Fink NE. Purification and partial characterization of an S-type lectin from blastula embryos of *Bufo arenarum*. *Comp Biochem Physiol*; 115:175-82, 1996.
- Elola MT, Fink NE. Further studies on vertebrate S-type lectins: cross-reactivity between toad and human lectins. *Biol Res*; 30:99-104, 1997.
- Elola MT, Cabada MO, Barisone GA, Fink NE. Immunohistochemical localization of a galectin from *Bufo arenarum* ovary. *Zygote*; 6:1-9, 1998.
- Elola MT, Iglesias M, Wolfenstein-Todel C, Fink N. Purificación y caracterización bioquímica parcial de una galectina-1 de bazo porcino. *Medicina*; 59: 636, 1999.
- Elola MT, Fink NE. Galectinas: estructura, especificidad glicídica y ligandos específicos. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 34:293-330, 2000a.
- Elola MT, Fink NE. Galectin-1 can stimulate superoxide production in human neutrophils. *Electr Lectin J: Lectins Biol Biochem Clin Biochem* [on line]. 13, 2000b. Available at: <http://plab.ku.dk/tebh/Lectins13/ElolaFink/paper.html>.
- English D, Cui Y, Siddiqui RA. Messenger functions of phosphatidic acid. *Chem Phys Lipids* 80:117-32, 1996.

- Erickson RW, Malawista SE, Garrett MC, Van Blaricom G, Leto TL, Curnutte JT. Identification of a thermolabile component of the human neutrophil NADPH-oxidase: a model for chronic granulomatous disease caused by deficiency of the p67-phox cytosolic component. *J Clin Invest* 89; 1587-95, 1992.
- Erwig LP, Gordon S, Walsh GM, Rees AJ. Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils. *Blood*; 93:1406-12, 1999.
- Etzioni A, Harlan JM. Cell adhesion and leukocyte adhesion defects. En: Nathan DG, Orki SH, editors. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood*. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. Cap. 30:375-88.
- Fajka-Boja R, Szemes M, Ion G, Legradi A, Caron M, Monostori E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol Lett*; 82:149-54, 2002.
- Fernández R, Suchard SJ. Syk activation is required for spreading and H₂O₂ release in adherent human neutrophils. *J Immunol*; 160:5154-62, 1998.
- Ferencik M, Bergendi L, Mandel L, Kovaru F, Stefanovic J. Lysosomal enzyme activities in polymorphonuclear leukocytes, macrophages, serum, and spleen of conventional, germ-free, and antigen-free Minnesota miniature swine. *Folia Microbiol (Praha)*; 30:65-75, 1985.
- Feuk-Lagerstedt E, Jordan ET, Leffler H, Dahlgren C, Karlsson A. Identification of CD66a y CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. *J Immunol*; 163:5592-8, 1999.
- Fink NE, Elola MT, Herkovits J. An endogenous lectin activity in soluble extracts of *Bufo arenarum*. *Acta Embryol Morphol Exp*; 5:169-76, 1984.
- Fink NE, Caron M, Joubert R, Elola MT, Bladier D, Herkovits J. Purification and some characteristics of a β -galactoside binding soluble lectin from amphibian ovary. *FEBS Lett*; 223:330-4, 1987.
- Ford Bainton D. Morphology of neutrophils, eosinophils, and basophils. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, editors. *Williams hematology*. 6 ed. New York: McGraw Hill, 2001. Cap. 64:729-44.
- Forsyth CB, Mathews HL. Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*. *Infect Immun* 70:517-27, 2002.
- Fouillit M, Joubert-Caron R, Poirier F, Bourin P, Monostori E, Levi-Strauss M et al. Regulation of CD45-induced signaling by galectin-1 in Burkitt lymphoma B cells. *Glycobiol*; 10:413-9, 2000.

- Fradin C, Poulain D, Jouault T. β -1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun*; 68:4391-8, 2000.
- Fred Brewer C. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta*; 1572:255-62, 2002.
- Fred Brewer C, Carrie Miceli M, Baum LG. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol*; 12:616-23, 2002.
- Frigeri LG, Zuberi RY, Liu FT. ϵ bp, a β -galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc ϵ RI) and activates mast cells. *Biochemistry* 32:7644-9, 1993.
- Fuortes M, Jin W, Nathal C. β_2 -integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 127:1477-83, 1994.
- Gabius HJ. Animal lectins. *Eur J Biochem*; 243:543-76, 1997.
- Gitt MA, Barondes SH. Evidence that a soluble β -galactoside-binding lectin is encoded by a family of genes. *Proc Natl Acad Sci USA*; 83:7603-7, 1986.
- Gitt MA, Barondes SH. Genomic sequence and organization of two members of a human lectin gene family. *Biochemistry*; 30:82-9, 1991.
- Gitt MA, Massa SM, Leffler H, Barondes SH. Isolation and expression of a gene encoding L-14-II, a new human soluble lactose-binding lectin. *J Biol Chem*; 267:10601-6, 1992.
- Gitt MA, Wiser MF, Leffler H, Herrmann J, Xia YR, Massa SM. Sequence and mapping of galectin-5, a β -galactoside-binding lectin, found in erythrocytes. *J Biol Chem*; 270:5032-8, 1995.
- Gitt MA, Colnot C, Poirier F, Nani KJ, Barondes SH, Leffler H. Galectin-4 and galectin-6 are two closely related lectins expressed in mouse gastrointestinal tract. *J Biol Chem*; 273:2954-60, 1998.
- Giuntoli JM, Estevez ME, Sen L, Peñalver JA. Defective function of the peripheral blood neutrophils in thalassemia major. *Am J Ped Hematol Oncol*; 6:215-7, 1984.
- Goldstein IM, Cerqueira M, Lind S, Kaplan HB. Evidence that the superoxide-generating system of human leukocytes is associated with the cell surface. *J Clin Invest* 59:249-54, 1977.
- Gu M, Wang W, Song WK, Cooper DNW, Kaufman SJ. Selective modulation of the interaction of $\alpha_7\beta_1$ integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci*; 107:175-81, 1994.

- Hadari YR, Paz K, Dekel R, Mestrovic T, Accilli D, Zick Y. Galectin-8: a new rat lectin, related to galectin-4. *J Biol Chem*; 270:3447-53, 1995.
- Hamrell MR, Hochstein P. Oxidative metabolism in guinea pig polymorphonuclear leukocytes: further evidence for a plasma membrane localization of latex- and Con A-activated oxidases. *J Reticuloendot Soc*; 25:615-21, 1979.
- Harrison FL, Chesterton CJ. Erythroid developmental agglutinin is a protein lectin mediating specific cell-cell adhesion between differentiating rabbit erythroblasts. *Nature*; 286:502-4, 1980.
- Harrison FL, Wilson TJG. The 14 kDa β -galactoside-binding lectin in myoblast cultures: localization by confocal microscopy. *J Cell Sci*; 101:635-46, 1992.
- Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem*; 268:26704-11, 1993.
- Hirabayashi J. A general comparison of two major families of animal lectins. *Trends Glycosci Glycotechnol*; 5:251-70, 1993.
- Hirabayashi J, Kasai K. Complete amino acid sequence of a β -galactoside-binding lectin from human placenta. *J Biochem*; 104:1-4, 1988.
- Hirabayashi J, Kasai K. The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology*; 3:297-304, 1993.
- Hirabayashi J, Ayaki H, Soma G, Kasai K. Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human 14 kDa β -galactoside-binding lectin. *Biochim Biophys Acta*; 1008:85-91, 1989.
- Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem*; 267:14167-74, 1992.
- Huflejt ME, Jordan ET, Gitt MA, Barondes SH, Leffler H. Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. *J Biol Chem*; 272:14294-303, 1997.
- Hughes RC. Mac-2: a versatile galactose-binding protein of mammalian tissues. *Glycobiology*; 4:5-12, 1994.
- Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*; 1473:172-85, 1999.

- Hynes MA, Gitt M, Barondes SH, Jessel TM, Buck LB. Selective expression of an endogenous lactose-binding lectin gene in subsets of central and peripheral neurons. *J Neurosci*; 10:1004-13, 1990.
- Iglesias MM, Rabinovich GA, Ivanovic V, Sotomayor C, Wolfenstein-Todel C. Galectin-1 from ovine placenta-amino-acid sequence, physicochemical properties and implications in T-cell death. *Eur J Biochem*; 252:400-7, 1998.
- Iglesias MM, Elola MM, Martínez V, Fink NE, Wolfenstein-Todel C. Identification of an equilibrium intermediate in the unfolding process of galectin-1, which retains its carbohydrate-binding specificity. *Biochim Biophys Acta*; 1648:164-73, 2003.
- Jagels MA and Hugli TE, Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis . *The Journal of immunology*, 148 (4) ,1119-1128 , 1992.
- Jouault T, Fradin C, Trinel PA, Bernigaud A, Poulain D. Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis*; 178:792-802, 1998.
- Joubert R, Caron M, Bladier D. Investigation on the occurrence of soluble lectins in mammalian nervous tissue extracts. *Comp Biochem Physiol B*; 85:859-63, 1986.
- Kano S, Isuka T, Ishimura Y, Fujiki H, Sugimura T. Stimulation of superoxide anion formation by the non-TPA type tumor promoters palytoxin and thapsigargin in porcine and human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*; 143:672-7, 1987.
- Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood*; 91:3430-8, 1998.
- Keresztes M, Lajtos Z. Major laminin-binding and F-actin-linked glycoproteins of neutrophils. *Cell Biol Int*; 21:543-50, 1997.
- Kilpatrick DC. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta*; 1572:187-97, 2002.
- Kletter Y, Bleiberg I, Golde DW, Fabian I. Antibody to Mol abrogates the increase in neutrophil phagocytosis and degranulation induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Eur J Haematol*; 43:389-96, 1989.
- Knibbs RN, Perini F, Goldstein IJ. Structure of the major Concanavalin A reactive oligosaccharides of the extracellular matrix component laminin. *Biochemistry*; 28:6379-92, 1989.
- Knowles R, Keeping H, Graeber T, Nguyen K, Garner C, D'Amico R, et al. Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am J Physiol* 272:1352-64, 1997.

- Kobayashi T, Robinson JM, Seguchi H. Identification of intracellular sites of superoxide production in stimulated neutrophils. *J Cell Sci*; 118:81-91, 1998.
- Kornfeld S. Structure and function of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Annu Rev Biochem*; 61:307-30, 1992.
- La M, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, et al. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol*; 163:1505-15, 2003.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 15:680-5, 1970.
- Laing JG, Robertson MW, Gritzmacher CA, Wang JL, Liu FT. Biochemical and immunological comparisons of carbohydrate-binding protein 35 and an IgE-binding protein *J Biol Chem*; 264:1907-10, 1989.
- Lasky LA. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science* 258:964-9, 1992.
- Lee CS, McCauley I, Hartman PE. Light and electron microscopy of cells in pig colostrum, milk and involution secretion. *Acta Anatomica*; 117:270-80, 1983.
- Leffler H, Barondes SH. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian β -galactosides. *J Biol Chem*; 261:10119-26, 1986.
- Lehrer RI. Functional aspects of a second mechanism of candidacidal activity by human neutrophils. *J Clin Invest*; 51:2566-72, 1972.
- Leonidas DD, Elbert BL, Zhou Z, Lefler SJ, Ackerman SJ, Acharya KR. Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins. *Structure*; 3:1379-93, 1995.
- Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate β -galactoside-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:1428-32, 1994.
- Liu FT. S-type mammalian lectins in allergic inflammation. *Immunol Today*; 14:486-90, 1993.
- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RY, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR. Expression and function of galectin-3, a β -galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am. J Pathol*; 147:1016-28, 1995.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*; 1572:263-73, 2002.

- Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the human dimeric S-Lac lectin (L-14-II). *J Mol Biol*; 233:553-5, 1993a.
- Lobsanov YD, Gitt MA, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human dimeric S-Lac lectin, L-14-II, in complex with lactose at 2.9-Å resolution. *J Biol Chem*; 268:27034-8, 1993b.
- Loeb WF, Bannerman RH, Rininger BF, Johnson AJ. Hematologic disorders. En: Benirschke K, Garner Fm, Jone TJ, editors. *Pathology of laboratory animals*. New York: Springer, 1978. Vol. 1:948-57.
- Lowell CA, Fumagalli L, Berton G. Deficiency of Src family kinases p59/61^{lck} and p58^{c-fer} results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol*; 133:895-910, 1996.
- Lundahl J, Dahlgren C, Gustavsson K, Hed J. Serum protects against azurophil granule dependant down-regulation of complement receptor type 1 (CR1) on human neutrophils. *Inflam Res*; 44:438-46, 1995.
- Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honoré B, et al. Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J Biol Chem*; 270:5823-9, 1995.
- Mahomed AK, Anderson R. Activation of human neutrophils with chemotactic peptide, opsonized zymosan and the calcium ionophore A23187, but not with a phorbol ester, is accompanied by efflux and store-operated influx of calcium. *Inflammation*; 24:559-69, 2000.
- Majewska E, Sulowska, Baj Z. Spontaneous apoptosis of neutrophils in whole blood and its relation to apoptosis gene proteins. *Scand J Immunol*; 52:496-501, 2000.
- Maldonado G, Porras F, Fernandez L, Vazques L, Zenteno Edgar. Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity. *Immunol Invest*; 23:429-36, 1994.
- Markert M, Andrews PC, Babior BM. Measurement of O₂- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol* 105:358-65, 1984.
- Marodi L, Korchak HM, Johnston, RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species. *J Immunol*; 146:2783-9, 1991.
- Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB, Scott RW. The role of bactericidal permeability-increasing protein as a natural inhibitor of bacterial endotoxin. *J Immunol*; 148:532-7, 1992.

- Marschal P, Herrmann J, Leffler H, Barondes SH, Cooper DNW. Sequence and specificity of a soluble lactose-binding lectin from *Xenopus laevis* skin. *J Biol Chem*; 267:12942-9, 1992.
- Mayo LA, Curnutte JT. Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol*; 186:567-74, 1990.
- Merahrabian M, Gitt MA, Sparkes RS, Leffler H, Barondes SH, Lusic AJ. Two members of the S-Lac lectin family, LGALS1 and LGALS2, reside in close proximity on human chromosome 22q12-q13. *Genomics*; 15:418-20, 1993.
- Merkle RK, Cummings RD. Asparagine-linked oligosaccharides containing poly-N-acetyllactosamine chains are preferentially bound by immobilized calf heart agglutinin. *J Biol Chem*; 263:16143-9, 1988.
- Merkle RK, Zhou Q, Schultz TK, Harper WB, Cummings RD. Characterization of an S-type lectin purified from porcine heart. *Arch Biochem Biophys*; 274:404-16, 1989.
- Metschnikoff E. Untersuchungen über die intracelluläre Verdauung bei wirbellosen Thieren. *Arb Zoologischen Inst Univ Wien*; 5:141-68, 1883.
- Moosig F, Csernok E, Kumanovics G, Gross WL. Opsonization of apoptotic neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) leads to enhanced uptake by macrophages and increased release of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). *Clin Exp Immunol*; 122:499-503, 2000.
- Muramoto K, Kamiya H. The amino-acid sequence of a lectin from Conger eel, Conger myriaster, skin mucus. *Biochim Biophys Acta*; 1116:129-36, 1992.
- Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N and Irimura T. *J Immunology*, 151(6), 3267-3273, 1993.
- Nair KS, Zingde SM. Adhesion of neutrophils to fibronectin: role of the cd66 antigens. *Cell Immunol*; 208:96-106, 2001.
- Nishi N, Shoji H, Seki M, Itoh A, Miyanaka H, Yuube K, et al. Galectin-8 modulates neutrophil function via interaction with integrin alpha M. *Glycobiology*; 13:755-63, 2003.
- Oda Y, Leffler H, Sakakura Y, Kasai K, Barondes SH. Human breast carcinoma cDNA encoding a galactoside-binding lectin homologous to mouse Mac-2 antigen. *Gene*; 99:279-83, 1991.
- Oda Y, Herrmann J, Gitt MA, Turck CW, Burlingame AL, Barondes SH, et al. Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. *J Biol Chem*; 268:5929-39, 1993.

- Ohannesian DW, Lotan D, Lotan R. Concomitant increases in galectin-1 and its glycoconjugate ligands (carcinoembryonic antigen, Lamp-1, and Lamp-2) in cultured human colon carcinoma cells by sodium butyrate. *Cancer Res*; 54:5992-6000, 1994.
- Ohashi I, Nishijima J, Murata A, Toda H, Kato T, Hayashida H, et al. Inhibitory effect of a synthetic protease inhibitor (gabexate mesilate) on the respiratory burst oxidase in human neutrophils. *J Biochem*; 118:1001-6, 1995.
- Ohyama Y, Kasai K. Isolation and characterization of the chick 14K β -galactoside-binding lectin gene. *J Biochem*; 104:173-7, 1988.
- Ohyama Y, Hirabayashi J, Oda Y, Oono S, Kawasaki H, Suzuki K, et al. Nucleotide sequence of chick 14K β -galactoside-binding lectin mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*; 134:51-6, 1986.
- Oka T, Murakami S, Arata Y, Hirabayashi J, Kasai KI, Wada Y, et al. Identification and cloning of rat galectin-2: expression is predominantly in epithelial cells of stomach. *Arch Biochem Biophys*; 361:195-201, 1999.
- Ozeki Y, Matsui T, Nitta K, Kawauchi H, Takayanagi Y, Titani K. Purification and characterization of β -galactoside binding lectin from frog (*Rana catesbeiana*) eggs. *Biochem Biophys Res Commun*; 178:407-13, 1991.
- Panyutich A, Shi J, Boutz PL, Zhao C, Ganz T. Porcine polymorphonuclear leucocyte generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted protegrins. *Infect Immun*; 65:978-85, 1997.
- Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis A. The quaternary structure of the plasma membrane b-type cytochrome of human granulocytes. *Biochim Biophys Acta*; 932:71-83, 1988.
- Paroutaud P, Levi G, Teichberg VI, Strosberg AD. Extensive amino acid sequence homologies between animal lectins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 84:6345-8, 1987.
- Perillo NL, Pace KE, Seilhamer J J, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*; 378:736-9, 1995.
- Pohl J, Pereira A, Martin NM, Spitznagel JK. Aminoacid sequence of CAP37, a human neutrophil granule-derived antibacterial and monocyte-specific chemotactic glycoprotein structurally similar to neutrophil elastase. *FEBS Lett*; 272:200-4, 1990.
- Poirier F, Timmons PM, Chan CTJ, Guénet JL, Rigby PWJ. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. *Development*; 115:143-55, 1992.
- Prentki M, Wollheim CB, Lew PD. Ca^{2+} homeostasis in permeabilized human neutrophils: characterization of Ca^{2+} sequestering pools and the action of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*; 259:13777-82, 1984.

- Pryzwansky KB, Steiner AL, Spitznagel JK, Kapoor CL. Compartmentalization of cyclic AMP during phagocytosis by human neutrophilic granulocytes. *Science*; 211: 407-10, 1981.
- Quinn MT, Mullen ML, Jesaitis A. Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. *J Biol Chem*; 267:73039, 1992.
- Rabinovitch GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu Fu-Tong, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*; 23:313-20, 2002.
- Rabinovich GA, Sotomayor CA, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol*; 30:1331-9, 2000.
- Raz A, Carmi P, Raz T, Hogan V, Mohamed A, Wolman SR. Molecular cloning and chromosomal mapping of a human galactoside-binding protein. *Cancer Res*; 51: 2173-8, 1991.
- Raz A, Pazerini G, Carmi P. Identification of the metastasis-associated, galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res*; 49:3489-93, 1989.
- Reim DF, Speicher DW. Microsequence analysis of electroblotted proteins. II: Comparison of sequence performance on different types of PVDF membranes. *Anal Biochem*; 207:19-23, 1992.
- Repine JE, White JG, Clawson CC. The influence of phorbol myristate acetate on oxygen consumption by polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med*; 83:911-20, 1974.
- Riber U, Lind P. Interaction between *Salmonella typhimurium* and phagocytic cells in pigs: phagocytosis, oxidative burst and killin in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *Vet Immunol Immunopathol*; 67:259-70, 1999.
- Robertson MW, Albrandt K, Keller D, Liu FT. Human IgE-binding protein: a soluble lectin exhibiting a highly conserved interspecies sequence and differential recognition of IgE glycoforms. *Biochemistry*; 29:8093-100, 1990.
- Sakakura Y, Hirabayashi J, Oda Y, Ohyama Y, Kasai K. Structure of chicken 16-kDa β -galactoside-binding lectin: complete amino acid sequence, cloning of cDNA and production. *J Biol Chem*; 265:21573-9, 1990.
- Sandberg AL, Mudrick LL, Cisar JO, Metcalf JA, Malech HL. Stimulation of superoxide and lactoferrin release from polymorphonuclear leukocytes by the type 2 fimbrial lectin of *Actinomyces viscosus* T14V. *Infect Immun* 56:267-9, 1988.

- Seetharaman J, Kanigsberg A, Slaaby R, Leffler H, Barondes SH, Rini JM. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem*; 273:13047-52, 1998.
- Sengelov H, Follin P, Kjeldsen L, Lollike K, Dahlgren C, Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during *in vivo* exudation of human neutrophils. *J Immunol*; 154:4157-65, 1995.
- Shrincoosky DM, Allen HJ, Bernacki RJ. Galaptin-mediated adhesion of human carcinoma A121 cells and detection of cellular galaptin-binding glycoproteins. *Cancer Res*; 53:2667-75, 1993.
- Smolen JE, Boxer LA. Functions of neutrophils. En: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, editors. *Williams hematology*. 6 ed. New York: McGraw Hill, 2001. Cap. 67:761-84.
- Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble β -galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem*; 262:7383-90, 1987.
- Spinelli OM, Vinai C. Apoptosis: una manera diferente de morir. *Prensa Med Argent*; 83:18-27, 1996.
- Stevenhagen A, van Furth R. Interferon-gamma activates the oxidative killing of *Candida albicans* by human granulocytes. *Clin Exp Immunol*; 91:170-5, 1993.
- Stone KL, LoPresti MB, Crawford JM, De Angelis R, Williams KR. Trypsin and chymotrypsin digestion of proteins. En: Matsudaira PT, editor. *Practical guide in protein and peptide purification for microsequencing*. San Francisco: Academic Press, 1989:31-47.
- Stossel TP. Phagocytosis (first of three parts). *N Engl J Med*; 290:717-23, 1974.
- Sumimoto H, Sakamoto N, Nozaki M, Sakaki Y, Takeshige K, Minakami S. Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*; 186:1368-75, 1992.
- Suzuki K, Namiki H. Phorbol 12-myristate 13-acetate induced cell death of porcine peripheral blood polymorphonuclear leucocytes. *Cell Struct Funct*; 23:367-72, 1998.
- Swaminathan GJ, Leonidas DD, Savage MP, Ackerman SJ, Acharya KR. Selective recognition of mannose by the human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (Galectin-10): a crystallographic study at 1.8Å resolution. *Biochemistry*; 38:13837-43, 1999.
- Tegeris AS, Earl FL, Curtis JM. Normal hematological and biochemical parameters of young miniature swine. En: Bustad LK, McClellan RO, editors. Seattle: Frayn Publishing, 1966:575-96.

- Timoshenko AV, Gabius HJ. Efficient induction of superoxide release from human neutrophils by the galactoside specific lectin from *Viscum album*. Biol Chem Hoppe-Seyler; 374:237-43,1993.
- Timoshenko AV, Kayser K, Drings P, Kolb G, Havemann K, Gabius HJ. Modulation of lectin-triggered superoxide release from neutrophils of tumor patients with or without chemotherapy. Anticancer Res; 13:1789-92, 1993.
- Timoshenko AV, Kayser K, Drings P, André S, Dong X, Kaltner H, Schneller M and Gabius HJ. Carbohydrate-binding proteins (plant/human lectins and autoantibodies from human serum) as mediators of release of lysozyme, elastase, and myeloperoxidase from human neutrophils. Res Exp Med; 195:153-62 .1995a.
- Timoshenko AV, Cherenkevich SN, Gabius HJ. *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. Biomed Pharmacother; 49:153-8, 1995b.
- Timoshenko AV, Kayser K, Gabius HJ. Lectin-triggered superoxide/H₂O₂ and granule enzyme release from cells. En: Rhodes JM, Milton JD, editors. Methods in molecular medicine 9: lectin methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 1997:441-51.
- Timoshenko AV, Dubovskaya LV, Karvatskaya OD, Zharkov VV, Andrę S, Gabius H. NO-dependent regulation of lectin- and menadione-induced H₂O₂ production by cells from pleural effusions of lung cancer patients and by immune cells. Int J Oncol; 14:793-8, 1999.
- Timoshenko AV, Gorudko IV, Maslova OV, André S, Kubawabara I, Liu F, Kaltner H, Gabius HJ. Analysis of selected blood and immune cell responses to carbohydrate-dependent surface binding of proto- and chimera-type galectins. Mol Cell Biochem; 250:139-49, 2003.
- Ting-Beall HP, Lee AS, Hochmuth RM. Effect of cytochalasin D on the mechanical properties and morphology of passive human neutrophils. Ann Biomed Eng; 23:666-71,1995.
- Trasher AJ, Keep NH, Wientjes F, Segal AW. Chronic granulomatous disease. Biochim Biophys Acta; 1227:1-24, 1994.
- Truong MJ, Gruart V, Liu FT, Prin L, Capron A, Capron M. Human eosinophils express functional IgE-binding molecules (Mac-2/εbp) of the S-type lectin family. Eur J Immunol; 23:3230-5, 1993a.
- Truong MJ, Gruart V, Kusnierz JP, Papin JP, Loiseau S, Capron A, et al. Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/εbp) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. J Exp Med; 177:243-8, 1993b.

- Tureci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *J Biol Chem*; 272:6416-22, 1997.
- Vasta GR. Invertebrate lectins: distribution, synthesis, molecular biology and function. En Allen HJ, Kisailus EC, editors. *Glycoconjugates: composition, structure and function*. New York: M. Dekker, 1992:543-634.
- Vasta GR, Pont-Lezica R. Plant and animal lectins. En: Adair WS, Mecham RP, editors. *Organization and assembly of plant and animal extracellular matrix*. San Diego CA: Academic Press, 1990:173-245.
- Vasta GR, Ahmed H, Amzel LM, Bianchet MA. Galectins from amphibian species: carbohydrate specificity, molecular structure and evolution. *Trends Glycosci Glycotechnol*; 9:131-44, 1997.
- Visegrady B, Than NG, Kilar F, Sumegi B, Than GN, Bohn N. Homology modelling and molecular dynamiva studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein Eng*; 14:875-80, 2001.
- Wada J, Kanwar YS. Identification and characterization of galectin-9, a novel β -galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem*; 272:6078-86, 1997.
- Wagstrom EA, Yoon KJ, Zimmerman JJ. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol*; 13:383-97, 2000.
- Waldell TK, Failkow L, Chan CK. Signaling functions of L-selectin: enhancement of tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase. *J Biol Chem*; 1995; 270:15403-11
- Walzel H, Schulz U, Neels P, Brock J. Galectin-1, a natural ligand for the receptor type protein tyrosine phosphatase CD45. *Immunol Lett*; 67:193-202, 1999.
- Walzel H, Blach M, Hirabayashi J, Kasai K, Brock J. Involvement of CD2 and CD3 in galectin-1 induced signaling in human Jurkat T-cells. *Glycobiology*; 10:131-40, 2000.
- Wang JL, Werner EA, Laing JG, Patterson RJ. Nuclear and cytoplasmic localization of a lectin-ribonucleoprotein complex. *Biochem Soc Trans*; 20:269-74, 1992.
- Wasano K, Hirakawa Y. Rat intestinal galactoside-binding lectin L-36 functions as a structural protein in the superficial squamous cells of the esophageal epithelium. *Cell Tissue Res*; 281:77-83, 1995.
- Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domain for recognition. *Annu Rev Immunol*; 6:381-405, 1988.

- Wilson TJG, Firth MN, Powell JT, Harrison FL. The sequence of the mouse 14 kDa beta-galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes. *Biochem J*; 261:847-52, 1989.
- Wintero AK, Fredholm M, Davies W. Evaluation and characterization of a porcine small intestine cDNA library: analysis of 839 clones. *Mamm Genome*; 7:509-17, 1996.
- Woo HJ, Shaw LM, Messier JM, Mercurio AM. The major non-integrin laminin binding protein of macrophages is identical to carbohydrate binding protein 35 (Mac-2). *J Biol Chem*; 265:7097-9, 1990.
- Wright CD, Hoffman MD. The protein kinase C inhibitors H-7 and H-9 fail to inhibit human neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun*; 135:749-55, 1986.
- Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (ϵ bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. *J Immunol*; 154:3479-87, 1995.
- Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*; 60:267-76, 2003.
- Yang RY, Hsu DK, Yu L, Ni J, Liu FT. Cell cycle regulation by galectin-12 , a new member of the galectin superfamily. *J Biol Chem*; 276:20252-60, 2001.
- Yokosawa H, Harada K, Igarashi K, Abe Y, Takahashi K, Ishii S.I. Galactose-specific lectin in the hemolymph of solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*: molecular, binding and functional properties. *Biochim Biophys Acta*; 870:242-7, 1986.
- Yomogida S, Nagaoka K, Saito K, Yamashita T. Evaluation of the effects of defensins on neutrophil functions. *Inflam Res*; 45:62-7, 1996.
- Yoshimura K, Toibana A, Kikuchi K, Kobayashi M, Hayakawa T, Nakahama K, et al. *Biochem Biophys Res Commun*; 145:712-8,1987.
- Zabucchi G, Berton G, Soranzo MR. Mechanism of the potentiating effect of cytochalasin B on the respiratory burst induced by Concanavalin A in leucocytes. *FEBS Lett*; 125:165-9, 1981.
- Zhelev DV, Alteraifi AM, Hochmuth RM. F-actin network formation in tethers and in pseudopods stimulated by chemoattractant. *Cell Motil Cytoskel*; 35:331-44, 1996.
- Zhou Q, Cummings RD. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch Biochem Biophys*; 281:27-35, 1990.
- Zhou Q, Cummings RD. L-14 lectin recognition of laminin and its promotion of in vitro cell adhesion. *Arch Biochem Biophys*; 300:6-17, 1993.