Excmo. Sr. Presidente.
Excmos. Sres. Académicos.
Señoras y Señores:

En primer lugar, quiero expresar públicamente, señores Académicos, toda la gratitud que os debo por la elevada e inmerecida distinción que me habéis otorgado al designarme para ocupar un sillón de esta Real Academia.

Mucho camino he recorrido desde que hace ya bastantes años, siendo alumno de Técnica Física, me incorporé, llamado por el Profesor Otero, a un pequeño laboratorio situado, probablemente, en el mismo lugar geográfico donde ahora nos encontramos. Allí aprendí —tenía buen maestro— a efectuar análisis de sedimentación de fondos marinos, y ese fue mi primer contacto con la investigación, el que hizo despertar mi vocación y el que me hizo ver, también, la amplitud de los horizontes de la Farmacia.

Con él y con todos cuantos me han ayudado en el transcurso de mi vida, mis maestros de ayer y de siempre, mis compañeros, mis colaboradores en las tareas docentes e investigadoras, quisiera yo compartir este alto honor que hoy se me confiere.

Mucha ha sido la ayuda que he necesitado y mucha la que he recibido. Permitidme que sólo cite a tres personas, que ya no están entre nosotros, y que hoy, allá en las alturas, compartirán su alegría con la de nuestros amigos de aquí. Mi Profesor, Ramón Portillo, junto al cual he pasado por todos los escalones de la docencia universitaria, y del que nunca podremos olvidar los que le tratamos personalmente, su gran calidad científica y humana, plena de comprensión, de sencillez y de modestia. Que estas palabras sirvan como homenaje de respeto a la memoria de su vida ejemplar.

Mi compañero de Claustro, José Lucas Gallego, con el que estuve siempre muy identificado, y del que recibí, aparte de su amistad que me honraba, no sólo cuanta ayuda solicité, sino también, la que,

conociendo mi innata timidez, él me adivinaba. A él se debe, durante su período al frente del Decanato de nuestra Facultad de Farmacia, la creación y dotación del Laboratorio de Técnicas Instrumentales que actualmente dirijo. Su vida ejemplar es para mí un recuerdo permanente.

Mi colaborador, Angel López Dolara, entrañable amigo, al que orienté en la realización de la primera de las tesis doctorales sobre fitohemaglutininas. De él aprendí su admirable paciencia en la labor cotidiana, con orden, sin horas, sin exigencias de ningún tipo; su conformismo ante las adversidades, sin un mal gesto; su gran compañerismo, siempre diligente en la ayuda a los demás y su culto a la amistad. Su prematura muerte nos dejó un hueco difícil de llenar.

* * *

Vengo a ocupar la vacante que dejara el Excmo. Sr. D. Antonio Pizarroso Villarejo, y el glosar brevemente su vida y su admirable dedicación a la Farmacia, constituye para mí una honrosa obligación.

En su breve apunte biográfico hallamos aspectos que parecen increíbles, pero a los que tuvieron la suerte de recibir sus enseñanzas, y a los que, como en mi caso, además, colaboraron con él y con su maestro, el Profesor D. Obdulio Fernández, en sus trabajos de investigación, sabemos bien que todo era posible para el Profesor Pizarroso.

Nace en la Villa de Sancti-Spiritus (Badajoz) el 24 de agosto de 1879. A los catorce años entra de aprendiz en la farmacia de su localidad, sabiendo ya leer correctamente en latín, imprescindible por aquel entonces para interpretar la Farmacopea, con sus sinonimias latinas y las prescripciones de algunos médicos. Después de un año pasa a la farmacia de pueblo de Siruela, en donde aprende a elaborar todas las preparaciones oficinales. A los dos años ya le tenemos en Badajoz, donde simultanea sus trabajos en la farmacia de D. Pedro Soria con los estudios eclesiásticos, como alumno externo, en el Seminario Conciliar, aprobando hasta el tercer curso.

Llamado a cumplir el servicio militar, es destinado al Laboratorio Central de Medicamentos, y al licenciarse ya no abandona Madrid, porque se incorpora a una sociedad benéfico-sanitaria titulada «La Esperanza». Veinte años trabaja en esta empresa, en cuyo tiempo, y

costeado por la misma, realiza sus estudios de Licenciatura y Doctorado en Farmacia, a la vez que se encarga de las siete farmacias que llegó a tener dicha entidad.

No hay error en los datos que siguen respecto a sus estudios.

En junio de 1910, a los treinta y un años de edad, hace el examen de ingreso en el Instituto de San Isidro y al año siguiente, el 30 de junio de 1911, aprueba el examen de Reválida del Grado de Bachiller.

En septiembre de ese mismo año aprueba parte del preparatorio, y en el curso de 1911 a 1912 ingresa en la Facultad de Farmacia, realizando los exámenes de Reválida de la Licenciatura el 27 de junio de 1913. Empieza sus estudios de doctorado, y desde ese momento se inicia su colaboración con el Prof. D. Obdulio Fernández en la Cátedra de Análisis de Medicamentos Orgánicos. En 1919 presenta su tesis doctoral sobre «Estudio de algunos fermentos de semillas oleaginosas (sintetasas y lipasas)», que obtiene la calificación de sobresaliente.

Si los avatares de la vida le hacen llegar un poco tarde a la Universidad, su espíritu juvenil hará bien fecundos en la docencia e investigación sus cuarenta años de colaboración con el Maestro don Obdulio Fernández. En septiembre de 1919 obtuvo por concurso-oposición la plaza de Profesor Auxiliar de Análisis de Medicamentos Orgánicos, cargo que mantuvo hasta su jubilación en 1960. Una veintena constituyen sus trabajos de investigación, orientados preferentemente al estudio de las enzimas en semillas oleaginosas, y publicados en los Anales de la Sociedad Española de Física y Química, y en los de la Real Academia de Ciencias. En uno de ellos, «Supuesta leucoantocianidina de algunas cubiertas de semillas», me cupo el honor de colaborar.

Es ejemplar la constante laboriosidad que caracteriza todas las etapas de su vida, lo que le permite compaginar sus tareas universitarias con la ayudantía de la Sección de Química del Instituto Nacional de Higiene, Alfonso XIII, del que era Director D. Santiago Ramón y Cajal, y Jefe de la Sección D. Obdulio Fernández. En los años 1934 y 1935 ocupó la presidencia de la Sección de Química Orgánica en esta Academia de Farmacia y colaboró con la industria farmacéutica, como Director Técnico del Instituto Thirf.

Estos datos —hay muchas más cosas admirables en su vida— no reflejan, sino muy brevemente, la personalidad, la categoría humana

del Profesor Pizarroso, que prestigió a nuestra profesión con su buen hacer, y a quien me honro en rendir público homenaje y el más respetuoso recuerdo.

* * *

Al contemplar las posibles alternativas sobre las que podría versar mi discurso de ingreso en esta Real Academia, he considerado como lo más conveniente desarrollar el tema de las fitohemaglutininas en su dimensión actual, no sólo por lo que pudiera ofrecer de contribución personal, indudablemente modesta, sino por considerarlo un tema muy farmacéutico, de esos en los que realmente puede observarse con toda su dimensión los grandes horizontes (botánicos, fisiológicos, bioquímicos, microbiológicos, parasitológicos, farmacodinámicos, analíticos, etc.) que nosotros vemos en la Farmacia, y muy demostrativo a la vez, de la información que puede obtenerse con el uso adecuado de las modernas Técnicas Instrumentales.

Las fitohemaglutininas o lectinas

Sustancias que poseen la propiedad de unirse a los hematíes y aglutinarlos, las encontramos ampliamente repartidas en la naturaleza, tanto en especies animales como en especies vegetales.

A las procedentes de plantas, por lo general de sus semillas, se les denomina fitohemaglutininas o lectinas, nombre este último propuesto por Boyd (1), con el que se quiere significar el poder selectivo de algunas de ellas en su interacción con determinados tipos de hematíes.

Los primeros hallazgos se remontan a 1888 en que Stillmark demuestra la actividad aglutinante de los extractos de semillas del *Ricinus communis*, achacable a la presencia en los mismos de una proteína muy tóxica, a la que se le denominó ricina, aunque más adelante tendremos ocasión de comprobar que ello no es rigurosamente cierto. La actividad antigénica de dichos extractos, junto a los de las semillas del *Abrus precatorius*, permitieron a Erlich, años más tarde, dar los primeros pasos en los trabajos que le llevaron al establecimiento de ciertos principios fundamentales de la moderna

Inmunología. Demostró, por ejemplo, que un animal podía hacerse inmune a una dosis mortal de ricina, por inyecciones subcutáneas repetidas de pequeñas cantidades del extracto, e igualmente, que el suero de este animal inmune podía neutralizar el efecto tóxico de la ricina. La especificidad y la reversibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo fueron otros tantos experimentos realizados con estas dos lectinas tóxicas: ricina y abrina.

En 1908, Landsteiner y Raubitschek pusieron de manifiesto que la actividad aglutinante de diferentes extractos de semillas dependía del animal del que procedieran los hematíes utilizados en las experiencias. A pesar de estos trabajos, durante muchos años se estuvo en la creencia de que la acción aglutinante de estas sustancias era inespecífica, hasta que en 1948 y 1949, Renkonen (2) y Boyd y Reguera (3) descubren la presencia en determinadas semillas, de fitohemaglutininas específicas para los hematíes de determinados grupos sanguíneos humanos.

Desde ese momento no han dejado de estar de actualidad los trabajos con estas complejas sustancias, en las que se han evidenciado nuevas y sorprendentes propiedades biológicas, algunas de las cuales serán descritas más adelante, de forma resumida.

Aislamiento y caracterización

Gran cantidad de trabajos con lectinas se han llevado a cabo empleando directamente el extracto crudo de las semillas. Ha sido, sin embargo, una constante preocupación de todos los investigadores en este campo, el tratar de conseguir el aislamiento de dichas sustancias para, tras su caracterización, intentar dar explicación a los procesos de interacción a que dan origen.

En la actualidad, y gracias a los poderosos métodos instrumentales preparativos, dicho aislamiento está siendo posible, por lo que son numerosas las fitohemaglutininas caracterizadas en estos tres últimos años.

Por lo general, los diferentes pasos de purificación pueden controlarse midiendo las respectivas actividades aglutinantes frente a hematíes, con la técnica de las diluciones seriadas, y determinación del punto final, bien por observación directa de la aglutinación o

por espectrofotometría, relativamente más segura. A título informativo señalaremos que una fitohemaglutinina altamente purificada, bajo condiciones experimentales adecuadas, puede presentar actividad aglutinante a concentraciones tan bajas, como la de 0,1 $\mu g/cm^3$.

Un esquema de purificación, muy útil en la mayoría de los casos, puede ser el siguiente:

1.° Extraer la semilla pulverizada con H_2O, solución salina fisiológica, o «buffer» de fosfatos de pH = 7,4 en la proporción de 10 por 100. La extracción puede prolongarse por doce a catorce horas en frigorífico, al cabo de las cuales se centrifuga la suspensión a 12.000 g. durante quince minutos, recogiéndose el sobrenadante, que constituye el extracto bruto.

2.° Calentar el extracto a 60° C durante veinte minutos para inactivar los diferentes complejos enzimáticos. Centrifugar a continuación y recoger el sobrenadante. Por supuesto que este tratamiento sólo se efectuará en el caso en que haya sido probado que la fitohemaglutinina de estudio es termoestable a dicha temperatura.

3.° Al sobrenadante se le añadirá $SO_4(NH_4)_2$ sólido para conseguir saturaciones del 30, 40, 60 u 80 por 100, según los casos. El precipitado formado se recoge por centrifugación y se redisuelve en agua destilada o en buffer de fosfato 10 mM de pH 6,5 a 7,5.

4.° Dializar esta solución a 4° C frente a un volumen 100 veces mayor de agua, operación que se repite una vez más.

A partir de esta solución, y vista la propiedad de ciertas lectinas de unirse a moléculas de glúcidos, específica y reversiblemente, serán las técnicas cromatográficas de afinidad las que van a permitir el aislamiento de estas sustancias, en ocasiones con un solo paso sobre la columna cromatográfica.

Con seguridad que, la fitohemaglutinina más estudiada hasta el presente, es la concanavalina A, obtenida de las semillas de la *Canavalia ensiformis*. Su aislamiento se efectúa sobre columnas de Sephadex G-50 ó G-100, usando como eluyentes solución 0,1 M de D-glucosa y 1 M de ClNa, o bien con «buffer» glicocola-ClH de pH 2.

La concanavalina A es una proteína que puede ser cristalizada, estando constituida por una mezcla de sub-unidades, todas ellas unas simples cadenas polipeptídicas, con un peso molecular de 25.500. En

ocasiones estas sub-unidades pueden estar desdobladas en dos fragmentos, lo que depende, al parecer, del método de purificación seguido.

El estudio de su estructura resulta complicado por los procesos de asociación de las sub-unidades dependientes del pH. Así, a valores de pH inferiores a 5,6, la concanavalina A en solución se encuentra como una especie molecular simple, formada por dos subunidades intactas o fragmentadas, con un peso molecular de alrededor de 55.0000. A pH superiores a 5,6 se forma un tetrámero de peso molecular 112.000. A pH 7 y superiores, la formación de estos tetrámeros va acompañada, en un proceso dependiente del tiempo, de un enturbiamiento de la solución, lo que parece indicativo de la formación de nuevos agregados superiores. Este proceso no se verifica cuando en la solución se encuentra presente la D-glucosa y concentración 0,01 M.

La existencia de especies moleculares múltiples se pone de manifiesto en los ensayos de electroforesis y de electroenfoque. En este último caso aparecen hasta ocho bandas de proteínas, que se reducen a dos, si la muestra de concanavalina A es incubada previamente con D-glucosa o D-manosa, mecanismo éste poco explicado en la actualidad, pero que se produce igualmente en la fitohemaglutinina obtenida de la *Sophora japonica*.

Cada una de las subunidades es portadora de un grupo receptor para los azúcares, llevando unida, además, un ión Ca^{2+} y uno de Mn^{2+} (o cualquier otro metal del grupo de transición) en sitios diferentes, distantes 5,3 Å. Al parecer, la presencia del metal del grupo de transición es condición necesaria para el enlace del ion Ca^{2+}, y la de ambos iones para el enlace del azúcar.

Los estudios con rayos X a 2 Å de resolución han permitido establecer la estructura tridimensional de la concanavalina A. La subunidad contiene 238 aminoácidos, siendo de forma globular, con unas dimensiones de 42 × 40 × 30 Å, y la unión de las cuatro subunidades idénticas, forman la molécula tetrámera de configuración pseudotetraédrica.

Los análisis por dicroísmo circular, en la región del ultravioleta próximo, en presencia de metil α-D-manopiranosa, sugiere que su enlace con estos azúcares a pH próximo a 7, va acompañado de cambios conformacionales de la molécula de concanavalina A.

La luminiscencia de esta molécula también ayuda a comprender

los posibles cambios conformacionales. En este caso, al contener las subunidades siete residuos de tirosina y cuatro de triptófano, se puede considerar, de acuerdo con la nomenclatura de Teale (4) como una proteína de la «clase B» en las que, tanto su fluorescencia como su fosforescencia están dominadas por los residuos de triptofano, por lo que la longitud de onda del máximo de emisión se sitúa alrededor del mismo valor que corresponde al triptófano libre. Si se enlaza la metil-α D-glucopiranosa, se origina una ligera disminución de su fluorescencia, mientras que, por el contrario, la eliminación de Ca^{2+} y del Mn^{2+} la incrementa ligeramente. Por su parte, el cociente de las señales de fluorescencia: fosforescencia y el tiempo de vida de la fosforescencia resulta ser similar al del triptófano (5).

Transformaciones químicas de la concanavalina A tetrámera por succinilación o acetilación la convierte en la forma dímera, sin que se modifiquen sus capacidades de enlace para los azúcares, ni sus propiedades biológicas, especialmente en lo referente a su actividad mitógena, con la ventaja de que se reduce la toxicidad de la molécula nativa (6).

De las semillas de *Canavalia gladiata* puede obtenerse una fitohemaglutinina cristalizada con idénticas características físicas, químicas y biológicas que la concanavalina A, salvo en los puntos isoeléctricos de las bandas observadas con ambas preparaciones en la técnica de electroenfoque.

Diversas especies del género *Phaseolus* constituyen excelentes fuentes de materia prima para la obtención de fitohemaglutininas con propiedades muy particulares.

De las semillas del *Phaseolus vulgaris*, variedad roja, se preparó un extracto crudo, que de hecho fue el primero que presentaba actividad mitógena, junto a la de aglutinante de hematíes y leucocitos. El adsorbente de afinidad, en este caso, era Sepharosa-tiroglobulina, con solución buffer de glicocola 0,05 M-ClH de pH 3 en ClNa 0,5 M (7). Se separan dos proteínas, ambas con actividad mitogénica y aglutinante, de pesos moleculares 91.000 y 110.000, que se conocen como L-PHA, que aglutina sólo a los leucocitos y E-PHA, con actividad aglutinante para leucocitos y hematíes.

Químicamente se trata de glicoproteínas, conteniendo los siguientes azúcares: fucosa, xilosa, arabinosa y manosa, además de glucosamina. Por digestión con tripsina pueden aislarse al menos ocho

glicopéptidos diferentes, uno de los cuales contenía únicamente manosa y glucosamina, mientras que los demás eran portadores de los azúcares más arriba indicados.

Son numerosas las técnicas analíticas empleadas en el estudio de la presencia de subunidades en PHA, habiéndose visto, por ejemplo, que en urea 8 M la E-PHA se disocia en ocho subunidades electroforéticamente diferentes.

De las semillas de *Phaseolus coccineus* L., sinónimo de *P. multiflorus* Lam, se puede obtener un extracto que en la fracción de 60-80 por 100 de saturación de $SO_4(NH_4)_2$ precipite las fitohemaglutininas. La cromatografía sobre CM-celulosa y DEAE-Sephadex A-50 permite obtener dos fitohemaglutininas, cuya composición en aminoácidos nos muestra la ausencia de cisteína y un alto contenido en ácido aspártico, serina y treonina.

Ambas PHA tienen un peso molecular alrededor de 120.000 según técnica de filtración por gel de Sephadex G-200, superfino, dato comprobado para la PHA-I por ultracentrifugación (120.000 ± 5.000). El punto isoeléctrico de esta última es de 6,9, y la electroforesis sobre gel en presencia de dodecil sulfato sódico muestra una sola subunidad con un peso molecular, aproximado, de 34.000. Es igualmente una glicoproteína que contiene glucosamina, un 7,3 por 100 de azúcares neutros, con la manosa como principal componente; su contenido en metales es del 0,24 por 100, distribuido así: Ca, 0,16 por 100; Zn, 0,056 por 100; Mg, 0,019 por 100; Mn, 0,007 por 100.

Las dos PHA son inespecíficas a los hematíes A, B, O, y mientras la PHA-I no tiene actividad mitogénica, la PHA-II es activa desde concentraciones de 25 $\mu g/cm^3$ en adelante (8).

De las semillas del *Phaseolus lunatus* se obtuvo el primer extracto que contenía lectinas específicas frente a los hematíes de sangre A. Esta propiedad de reaccionar fuertemente con las sustancias de grupo A, ha servido para la purificación de las mismas, a través de un sistema de cromatografía de afinidad a base de polileucil —sustancia de grupo de sangre humana A, y como eluyente, solución 0,4 M de N-acetil-D-galactosanima. Se separan dos especies moleculares (isolectinas), ambas glico-proteínas, con los mismos aminoácidos e idéntica composición en carbohidratos, pero con diferente peso molecular. La electroforesis sobre geles de poliacrilamida, en presencia

de dodecil sulfato sódico y β-mercaptoetanol, desdoblan ambas isolectinas en subunidades idénticas de peso molecular 31.000.

Ambas isolectinas tienen dos restos de cisteína por cada subunidad, habiéndose demostrado que la existencia de grupos-SH libres es condición necesaria para la actividad biológica de las mismas, ya que los reactivos de grupos —SH son potentes inhibidores de su actividad aglutinante. Contienen, igualmente, Mn^{2+}, esencial también para la actividad biológica, y Ca^{2+}, cuyo papel es menos claro.

En las semillas de la especie *Glycine max* se encuentra una lectina que puede separarse por cromatografía sobre hidroxilapatito o mejor por técnica de afinidad sobre Sepharosa-D-galactosilamina, eluyendo con solución al 0,5 por 100 de D-galactosa. Es una glicoproteína con un peso molecular de 110.000 ó 120.00, según datos de ultracentrifugación o filtración por gel, respectivamente. Es un tetrámero, al estar formada por cuatro subunidades de peso molecular 30.000 ± 500, y contiene un 4,5 por 100 de D-manosa y 1,2 por 100 de N-acetil-D-glucosamina. La digestión con pronasa libera un glicopéptido que contiene, junto a los azúcares citados, un único aminoácido, el ácido aspártico. Tiene afinidad específica para la N-acetil-D-galactosanina, que resulta, por tanto, un potente inhibidor de sus propiedades biológicas.

De las semillas de *Lens culinaris* o *Lens sculenta* es posible aislar, bien por cromatografía de cambio iónico, bien por afinidad sobre Sephadex G-100 o G-150, dos fitohemaglutininas, o isolectinas, que se diferencian por sus movilidades electroforéticas en «buffer» alcalino sobre gel de poliacrilamida-almidón. Diferentes variedades de *Lens sculenta* difieren en las proporciones de estas isolectinas, habiendo una con igual contenido de ambas (9, 10).

Las dos son glicoproteínas, presentando igualmente, *a*) identidad a ensayos inmunoquímicos; *b*) pesos moleculares similares; *c*) casi idéntica composición en aminoácidos; *d*) el mismo conjunto de péptidos tras digestión con tripsina. —Por tratamiento ácido, o por urea 8M y filtración por Bio-Gel P-100, se separan en dos subunidades diferentes, la H, de peso molecular alrededor de 18.000, y la L, de 8.000—. Las fitohemaglutininas nativas contienen Ca^{2+} y Mn^{2+}, perdiéndose este último al separarse en las subunidades. Los datos cuantitativos son:

	Mn %	Ca %	Azúcares neutros %
Fitohemaglutinina	0,21	0,15	2,5
Subunidad II	0	0,12	3,2
Subunidad I	0	0,34	2,2

La actividad biológica se pierde también, de manera irreversible, con la eliminación del Mn^{2+} al verificarse, posiblemente, un proceso de desnaturalización.

Del *Pisum sativum* puede aislarse, por cromatografía sobre Sephadex G-100, una fitohemaglutinina compuesta de dos cadenas polipeptídicas unidas no-covalentemente, con unas subunidades, la α con PM = 7.000 y la β de PM = 17.000. La lectina tiene, a su vez, un peso molecular de 49.000 (dos subunidades α y otras dos β) y contiene menos del 0,5 por 100 de carbohidratos.

Los análisis de aminoácidos nos muestran la presencia de grandes cantidades de treonina y ácido aspártico.

Sus propiedades biológicas son semejantes a las de la concanavalina A y a las procedentes del género *Lens*, en cuyo grupo se encuadra por su afinidad específica para enlazar azúcares (α-D-glucosa y α-D-manosa) (11).

Del germen del trigo (*Triticum vulgaris*) es posible obtener una fitohemaglutinina en forma cristalizada. En este caso, el producto bruto de precipitación del extracto al 45 por 100 de saturación en $SO_4(NH_4)_2$, se cromatografía sucesivamente por Sephadex G-50, CM-celulosa y Sepharosa-ovo-mucoide (afinidad).

Es una proteína con un PM — 26.000 ± 1.000, según datos de electroforesis sobre gel de poliacrilamida, que tiene de característico un contenido muy elevado de restos de cisteína 38, junto a 51 de glicocola y 4 de triptofano. Esto lo distingue de las otras fitohemaglutininas que, o no contienen ni cistina ni cisteína, o sólo la tienen en muy pequeñas proporciones.

Su contenido en triptófano la hace fluorescente (λ_{ex} = 290 nm, λ_{em} = 348 nm), lo que permite, a través de la medida de las señales de fluorescencia (variaciones hasta del 45 por 100 y saltos en λ_{em}

de 10 nm), poder seguir los procesos de asociación de la misma con los azúcares respectivos (12).

De los primitivos productos, ricina y abrina, procedentes del *Ricinus communis* y del *Abrus precatorius* respectivamente, que poseían una actividad aglutinante muy potente, y que eran, a la vez, extremadamente tóxicos, es posible en la actualidad separar las fitohemaglutininas de las respectivas toxinas, que, a su vez, tienen también actividad aglutinante (13, 14). El proceso requiere pasos cromatográficos sucesivos sobre DEAE-celulosa, Sepharosa-4B, CM-52, DE-52 y centrifugación final en gradiente de sacarosa.

Sus pesos moleculares, según datos de sedimentación y electroforesis sobre gel, dan unos valores de 120.000 para la lectina del *R. communis* y 134.000 para la del *A. precatorius*. Tienen una especificidad dirigida contra la D-galactosa y estructuras estéricamente relacionadas con ella.

Aglutinan espontáneamente a los hematíes, lo que es indicativo de tener, al menos, dos puntos de enlace, lo que les permite servir de puente y unir así dos hematíes —Las toxinas abrina y ricina, por su parte, no aglutinan a igual concentración, pero sí lo hacen cuando se añade antisuero, anti-abrina o anti-ricina, lo que sugiere que ambas toxinas son lectinas monovalentes.

El extracto de las semillas del *Dolichos biflorus* tiene actividad aglutinante específica sobre hematíes de sangre A. Por cromatografía sobre un adsorbente formado por polileucina: sustancia de grupo A + H de perro, es posible separar un producto que aparece homogéneo por técnicas de electroforesis sobre gel, isoelectroenfoque, sedimentación e inmuno-difusión frente a antisueros obtenidos en conejos del extracto crudo. La cromatografía sobre concanavalina A-sepharosa separa, sin embargo, dos componentes, uno que se retiene sobre la columna y otro (el 12 por 100 aproximadamente), que se eluye. Ambas formas son activas, con títulos anti-A similares, y con unos pesos moleculares de 113.000 y 109.000 respectivamente (15).

De las semillas de *Vicia graminea* puede obtenerse la, hasta ahora, única fitohemaglutinina que posee actividad específica anti-N (16).

La separación cromatográfica se efectúa sobre DEAE-celulosa y Sephadex G-150. La fitohemaglutinina separada se presenta homogénea por ultracentrifugación, electroforesis sobre gel, inmunoelectroforesis y electroenfoque. Resulta ser una glicoproteína ácida con

un 7,3 por 100 de carbohidratos y alto porcentaje de serina. Su peso molecular aproximado es de 100.000, siendo capaz de disociarse en cuatro subunidades de 25.000.

No se ha encontrado ningún monosacárido inhibidor específico de la actividad de esta lectina, probablemente porque se requieran estructuras más complejas para una eficiente interacción.

De la *Bandeiraea simplicifolia* se consigue separar una fitohemaglutinina con actividad anti-B, con lo que se completa la gama de lectinas útiles para la tipificación de grupos sanguíneos humanos (17).

El aislamiento se efectúa, en este caso, de la fracción del extracto precipitable al 74 por 100 de saturación en $SO_4(NH_4)_2$ y cromatografía de afinidad sobre columnas de «Bio-Gel melibionato», eluyendo con galactosa 0,2 M.

Su peso molecular es de 114.000, con una estructura en subunidades semejante a las del género *Phaseolus*. La composición en aminoácidos es la que corresponde a otras lectinas por su abundancia en los acídicos e hidroxílicos y la ausencia de cisteína.

Es una glicoproteína que requiere la presencia de Ca^{2+} para actuar y presenta actividad específica para azúcares con anillos de la piranosa (metil α-D-galactopiranosa).

La primera de las lectinas separadas de especies pertenecientes a la familia Celastraceae procede del *Evonymus Eropaea* L. (18), que presenta actividad anti ($H + B + A_2$). La fracción activa precipita al 40 por 100 de saturación en $SO_4(NH_4)_2$, y la purificación se hace por electroforesis sobre gel a escala preparativa a pH 8,9, en la que separan, un componente lento (I) y una mezcla de otras isolectinas de parecida movilidad. El componente lento es una glicoproteína con un PM-127.000, que contiene glucosamina, un 4,7 por 100 de azúcares neutros, altas concentraciones de ácido aspártico, alanina y glicina, y cantidades significativas de serina, treonina, cisteína y metionina. Su punto isoeléctrico es de 4,4-4,5, habiéndose detectado la presencia de los siguientes iones metálicos: Ca, 0,25 por 100; Mg, 0,019 por 100; Zn, 0,034 por 100, y Cu, 0,026 por 100.

Por su parte, las isolectinas tienen PM. 119.000; 1,9 por 100 de azúcares neutros e idénticos metales, con la excepción del Cu, que está ausente.

Otras lectinas, igualmente caracterizadas, proceden de las especies

botánicas *Bauhinia purpurea*, también anti-N, *Sophora japonica* anti (A + B), *Wistaria floribunda*, *Robinia pseudoacacia* y *Vicia ervilia*.

Nuestra aportación a este campo podemos resumirla fundamentalmente al estudio de dos fitohemaglutininas, la procedente del *Solanum tuberosum* y la del *Myrtus communis*.

La aglutinina procedente de los tubérculos del *Solanum tuberosum* es una glicoproteína con un contenido en carbohidratos del 51 por 100, siendo su principal componente la arabinosa, que constituye el 92 por 100, con pequeñas cantidades de galactosa, glucosa y glucosamina.

Su aminoácido más abundante es la hidroxiprolina, con el 16 por 100, siendo muy rica en cistina, 11.5 por 100, conteniendo un aminoácido básico, la ornitina, muy poco común en proteínas vegetales (19).

En colaboración con la Dra. González (20) estudiamos las fitohemaglutininas presentes en 15 variedades de *Solanum tuberosum*, facilitadas por la Estación de Mejora de la Patata, del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas, algunas como la *Alpha*, *Patrones*, *Victor*, *Merkur*, con un alto contenido en las mismas.

De las semillas del *Myrtus communis*, por su parte, tenemos en fase muy avanzada su proceso de aislamiento. En colaboración con la Srta. Ródenas (21) hemos desarrollado una sistema de afinidad a base de hematíes humanos fijados con glutaraldehído, que enlaza a las fitohemaglutininas del extracto, las cuales se eluyen, posteriormente, con un «buffer» de glicina a varios pH, sin que la actividad biológica de la fitohemaglutinina sufra alteración.

Aspectos botánicos

Desde la iniciación de los estudios sistemáticos de las fitohemaglutininas ha sido tema de interés de los investigadores el buscar respuesta al interrogante del papel que estas sustancias están desempeñando en aquellas especies botánicas que las poseen.

El hecho de encontrarlas localizadas con preferencia en aquellas partes de la planta en donde las proteínas se acumulan como reservas nutritivas (semillas, tubérculos, látex de ciertas euforbiáceas) hacía pensar en una misión similar, máxime cuando se pudo comprobar que aparecen en las semillas en un momento determinado de

su desarrollo, aumenta su concentración de forma paralela al de las proteínas, y desaparecen cuando esta reserva nutritiva la emplea la semilla durante su fase germinativa.

En realidad, poco se conoce del verdadero papel de las lectinas, cuya estabilidad en algunas semillas está perfectamente demostrada. Jones (22), con semillas de *Vicia cracca* recolectadas de pliegos de herbarios con más de cien años de antigüedad, ha podido preparar extractos con actividad anti A específica, característica de esta planta.

Se ha sugerido que las lectinas podrían ser unos anticuerpos producidos por la planta en respuesta a la acción agresora de las bacterias del suelo, o más simplemente, actuar como agentes de protección frente a los ataques bacterianos. En este caso, la acción podría concretarse a una inhibición de las enzimas hidrolizantes de las paredes celulares de los hongos.

Alternativamente, las lectinas podrían ejercer funciones en el transporte y almacenamiento de los azúcares, o también, servir de enlace de enzimas glicoproteicos a una batería de sistemas de multienzimas. Las que presentan actividad estimuladora de la mitosis celular, podrían estar actuando como agentes de control de la diferenciación celular y división, particularmente durante el proceso de germinación.

Hay un trabajo muy interesante de Clarke, Knox y Jermyn (23) en el que tratan de demostrar que, al menos ciertas lectinas, pueden estar envueltas en procesos de auto-reconocimiento entre células de las plantas. Describen la existencia de unas nuevas lectinas, muy extendidas en las plantas, a las que denominan β-lectinas, químicamente reconocidas como glicoproteínas, con 80 por 100 de carbohidratos y 20 por 100 de proteínas. Estas β-lectinas pueden interaccionar con el determinante β-glicosídico de un antígeno artificial, un carbohidrato, que se prepara por copulación de 4 amino-fenil-glucósidos con floroglucina, con formación de productos de alto peso molecular, rojos, y con múltiples grupos de carbohidratos con una clara y definida configuración. Esta propiedad les hace ser unos marcadores específicos para dichas lectinas, fáciles de localizar en cortes histológicos.

Utilizando semillas de *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus lunatus* preparan cortes de los cotiledones, en los que localizan la concanavalina A o las fitahemaglutininas con marcadores fluorescentes, y las β-lectinas con los anteriormente citados.

Los resultados obtenidos muestran que tanto la concanavalina A como las fitohemaglutininas del *Phaseolus*, se localizan en los espacios citoplasmáticos, en contraste con las β-lectinas, que aparecen asociadas con las membranas celulares, concentradas en las paredes celulares y espacios intercelulares. Esto último permite mantener la hipótesis de su posible función como factores de auto-reconocimiento, determinando las relaciones de las células vegetales en los tejidos y órganos. No hay que pensar que este papel en la comunicación celular quede restringido a las células parenquimatosas de los cotiledones, ya que las β-lectinas se localizan igualmente en otros órganos y tejidos de la planta.

Se especula también sobre su papel determinante en la resistencia a las enfermedades. *Pseudomonas* y otros microorganismos infectantes de las hojas, por ejemplo, penetrarán en ellas vía espacios intercelulares; la tolerancia o resistencia, en definitiva una forma de reconocimiento, puede estar determinada por las β-lectinas, estratégicamente situadas en el espacio extracelular.

Este posible papel de agente determinante de la resistencia a enfermedades podría ser ampliado al de agente defensivo frente a insectos depredadores de semillas. Hay un trabajo muy demostrativo en este sentido de Janzen, Buster y Liener (24), que preparan unas semillas artificiales adicionadas de polvo de semillas de *Phaseolus vulgaris* para obtener concentraciones de 0,1, 1,5 y 10 por 100. La hembra de *Callosobruchus maculatus* deposita sus huevos sobre las semillas anteriores y otras de control sin polvo de *Phaseolus*, y por tanto, sin fitohemaglutininas. En cada semilla se dejan sólo 10 huevos, eliminando los demás, incubándolos durante 73 a 80 días para asegurar la salida de todos los escarabajos sobrevivientes. Las semillas de control producían una media de 4,5 larvas; las de 0,1 por 100, 3,6; en las del 1 por 100 sólo dos adultos raquíticos se obtuvieron de un total de 14 semillas, y ninguno sobrevivió en las del 5 por 100. Si las experiencias se repetían pero con la fitohemaglutinina del *Phaseolus* inactivada por el calor, las medias de supervivencia por semillas, a concentraciones equivalentes a las anteriores, fueron: 6; 6,5; 5,8; 4,5 y 4,5.

Otros datos experimentales que apuntan igualmente hacia e e papel de reconocimiento, que se atribuye a las lectinas, son los obtenidos por Bohlool y Schmidt (25) al estudiar el papel de las fitohema-

glutininas de la soja (*Glycine max*) en la unión simbiótica específica del *Rhizobium japonicum* con las raíces de la planta. Para seguir el proceso de interacción de la lectina con las bacterias, marcan aquélla con isotiocianato de fluoresceína, que la hace fluorescente y puede ser localizada por microscopía de fluorescencia. Comprueban que de todas las cepas de *Rhizobium* estudiadas, únicamente fijan a las fitohemaglutininas de las semillas de soja, aquellos capaces de formar en sus raíces los nódulos fijadores de nitrógeno. Resulta hipotético pensar que las fitohemaglutinias presentes en las raíces servirán de punto de reconocimiento y enlace para determinados polisacáridos sobre la superficie del *Rhizobium*, fase previa, y necesaria, para la siguiente formación del nódulo.

Otro aspecto botánico, que consideramos muy interesante, es la utilización de las fitohemaglutininas como un elemento nuevo de aporte de datos en problemas taxonómicos. Nos referiremos a algunos datos concretos, pues el problema general ya fue presentado por el Prof. Rivas Martínez en su discurso de ingreso en esta Academia.

Tenemos el trabajo de Rongé (26), que de los extractos de las semillas de: *Vicia faba*, *Lens sculenta* y *Pisum sativum* separan, de una parte, las proteínas precipitables al 30 y 60 por 100 de saturación en $SO_4(NH_4)_2$, y de otra, las fitohemaglutininas purificadas de cada una de las semillas. Con estos productos, por inyección en conejos, preparan los inmunosueros correspondientes IS_{30-60}, IS_{fito}.

Usando ahora las proteínas obtenidas de semillas de especies pertenecientes a diferentes tribus de las *Papilionáceas*, y los inmunosuelos anteriores, se hacen inmunoelectroforesis y se observan los arcos de precipitación.

El IS_{30-60} frente a proteínas de semillas que corresponden a especies de la tribu de las *Vicieas* (*Lens culinaris*, *Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum*, *Lathyrus vernus*, *Cicer arietinum*), producen de 8 a 15 arcos de precipitación, mientras que con las especies de tribus diferentes, *Phaseoleas*, *Trifolieas*, *Loteas*, *Galegeas*, *Sophoreas*, *Genisteas* (*Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Lotus corniculatus*, *Robinia pseudoacicia*, *Sophora japónica*, *Laburnum alpinum*, etc.), sólo daban 4 a 6 arcos de precipitación.

Cuando se utiliza para la experiencia el IS_{fito}, únicamente aparecen

arcos de precipitación en las que corresponden a la tribu de las Vicieas, resultando la prueba negativa en las restantes especies.

Parece, pues, que los ensayos de inmunoelectroforesis efectuados de la forma indicada, pueden reflejar afinidades de orden sistemático, y en el caso que nos ocupa, confirman la pertenencia de los géneros *Vicia*, *Lens*, *Lathyrus* y *Pisum* a la tribu de las *Vicieas*, y la individualidad de ésta respecto a otras tribus de las Papilionáceas.

La taxonomía del género *Candida* se ha hecho a través de procedimientos diversos. Numerosos investigadores se han interesado por la constitución de la pared celular, cuyo estudio se ha abordado por vías diferentes: extracción química, degradación enzimática, comparación de fracciones antigénicas con ayuda de inmunosueros, examen de la estructura por RMN o microscopía electrónica, etc.

Guillot, Scandariato y Coulet (27) abordan el problema utilizando las lectinas como medio de reconocimiento de estas levaduras, a través de los procesos de aglutinación. Para el ensayo se prepara una batería de tubos con 0,3 cm³ de las diferentes aglutininas (*Pisum*, *Lathyrus*, *Lens*, *Phaseolus*, *Ricinus*, *Hygrophorus*, etc.), a los que se añaden 0,2 cm³ de una suspensión de levadura que contiene 60.000 células por cm³. Después de dos horas a temperatura ambiente y doce a + 4° C, se hace la lectura a ojo desnudo.

Las diferencias en la naturaleza, o en la localización de los azúcares al nivel de la pared celular de las levaduras pueden explicar que la acción de la fitohemaglutinina de *Lens sculenta*, por ejemplo, sea discreta o nula sobre especies que, por otra parte, son aglutinadas fuertemente por las fitohemaglutininas de *Pisum* y *Lathyrus*, como es el caso de *Candida intermedia*, *C. macedoniensis*, *C. cloacae*, *C. quercum*, *C. silvicultrix* y *C. reylanoides*.

Sobre un plano práctico se puede considerar que las lectinas serán muy útiles en la rápida identificación de ciertas especies. Tal es el caso de la lectina de *Russula nigricans*, que aglutina fuertemente las seis cepas de *Candida albicans* ensayadas y sólo otras tres especies (*C. succica*, *C. sake* y *C. norvegensis*) de otras tantas 108 especies analizadas, y lo mismo la lectina del *Phallus impudicus*, que sólo aglutina, y muy fuertemente, a la *Candida steatolytica*, o la de *Datura stramonium*, que sólo es activa sobre la *C. oleophila*.

Resulta, pues, evidente que la aplicación de estas técnicas «pseudo-inmunológicas» puede aportar nueva información al conocimiento

de la naturaleza de las membranas de las levaduras y contribuir, en algunos casos, a facilitar la identificación de las especies.

En este mismo campo se puede incluir el trabajo de Watson, Knox y Creaser (28) respecto a la interacción de la concanavalina A con tipos de polen o sus extractos, medida por técnicas de inmunodifusión en placas de agar. Cuando es directamente el polen el que se investiga, se sitúa éste sobre el gel de agar en el cual está incluída la concanavalina A, observándose, en este caso, la formación de un precipitado, que crece radialmente, desde la superficie del grano de polen. Este precipitado, en los casos de reacción positiva, como en *Zea mays* y *Euchlaena mexicana*, suele ser visible a los dos minutos, siendo muy intenso después de tres horas.

Invetigan el polen de 42 especies, en las que se encontraban las más importantes fuentes de alergenos.

Las posibilidades de identificación que encierra esta técnica se ponen de manifiesto en los resultados experimentales, donde se observa claramente el contraste entre especies «festucoides», en las que sólo una de veintitrés da una clara reacción positiva, y las especies «no festucoides» en las que son 8 de 19 las positivas. La intensidad de la reacción también puede ser demostrativa, pues así como los precipitados con *Andropogon* y *Cynodon* son muy densos, los de *Festuca rubra*, *Phragmites australis*, *Stipa falcata* y *Echinochloa crus-galli* son muy débiles y, en cualquier caso, reproducibles.

Si se tiene en cuenta el gran número de lectinas susceptibles de ser usadas como reactivos precipitantes, es indudable que las posibilidades que encierra la técnica en los estudios de caracteres palinológicos, son muy grandes.

INTERACCIÓN CON HEMATÍES

Ya hemos indicado que el proceso de interacción fitohemaglutininas-hematíes, con aglutinación de éstos, fue el motivo inicial de las investigaciones con dichas sustancias.

Durante muchos años el motivo principal de las investigaciones era el detectar en las diferentes especies botánicas lectinas, específicas o no, para las diferentes sangres humanas y animales.

En un rápido repaso podemos citar los trabajos de Renkonen (29),

que estudió 99 especies de las Papilionáceas, con 6 positivas: *Vicia cracca, Lotus tetragonolobus, Laburnum alpinum, Cytisus sessilifolius, C. ratibonensis* y *C. praecox*.

Boyd y Requera (30) amplía la investigación a 63 familias, con un total de 262 especies, destacando por su inportancia el hallazgo de una fitohemaglutinina anti-A en el *Phaseolus lunatus*, ya citado anteriormente, y una anti-B, muy débil, en el *Vitis aestivalis*. Cazal y Lalaurie (31) encuentran 85 especies positivas en las Papilionáceas, de 420 estudiadas. Bird (32) presenta, como aportación destacable, al *Dolichos biflorus* específico anti-A, con una potencia 500 veces mayor para los hematíes A_1 que para los A_2, lo que permite diferenciarlos. Ottensooser y Silberschmidt (33) encuentran en la *Vicia graminea* lectinas específicas anti-X, citada también por Makela (34) en la *Bauhinia purpurea*.

Especies españolas, por un total de 375, fueron estudiadas por nosotros, en colaboración con Fernández-Galiano y Dolara (35, 36 y 37), con 197 positivas, destacando, entre otras: el *Phlomis purpurea*, el *P. herba-venti* y el *P. crinita*, anti (A + B), el *Sambucus ebulus*, anti H(O), y el *Myrtus communis*, con fitohemaglutininas inespecíficas de enorme interés.

La primera información respecto al papel de determinados azúcares, como determinantes de la especificidad grupal de los hematíes, fue obtenida por Watkins y Morgan (38) al poner de manifiesto reacciones de enlace de las fitohemaglutininas y azúcares diversos, con efectos inhibidores de las respectivas actividades aglutinantes de las lectinas. Concretamente si la fitohemaglutinina anti-A de las semillas de *Vicia cracca* o *Phaseolus lunatus* es inhibida por la N-acetil-D-galactosamina, parecía concluyente que este compuesto debería ser uno de los determinantes de la especificidad de la sangre humana del grupo A. Por la misma razón, si las fitohemaglutininas anti H(O) del *Lotus tetragonolobus* se inhibía por metil-α-L-fucopiranósido, era evidente que un residuo α-L-fucosa es un determinante de la especificidad H(O). Ambas hipótesis han sido confirmadas por estudios posteriores.

Cuando las experiencias de inhibición se efectúan con aquellas fitohemaglutininas inespecíficas, es decir, las que aglutinan hematíes de cualquier grupo, se puede hacer una clasificación según el tipo de azucar inhibidor: por ejemplo, la concanavalina A es inhibida por

α-D-manopiranosa, α-D-glucopiranosa y α-N-acetil-D-galactosamina, la de *Glycine max*, por N-acetil-galactosamina, y la de *Ricinus communis* por la D-galactosa. En este caso, sin embargo, no puede hablarse de identidad de estos azúcares con los determinantes de grupo de los hematíes, sino que la interacción se verifica a través de grupos sacáridos receptores, independientes de las sustancias de grupo, y que se encuentran en la superficie de todos los hematíes.

La investigación actual, en este campo, presenta vertientes diferentes, que resumimos a continuación.

Hay trabajos orientados en la búsqueda continuada de fitohemaglutininas específicas, con intentos de separación de aquellas polivalentes. Tal sería el caso, por ejemplo, del trabajo de Bird y Wingham (39), en el que estudian diferentes especies del género *Salvia*, hallando en la *S. sclarea* y *S. haematodes* fitohemaglutininas específicas para hematíes Tn, y en la *S. farinacea* y *S. horminum*, aglutininas anti-Tn y anti-Cad, perfectamente separables. Estas lectinas son de gran valor potencial en los estudios de poliaglutinación de hematíes.

Otro ejemplo podría ser el trabajo de Moon y Wiener (40), que logran separar una fitohemaglutinina anti-N de las hojas de *Vicia unijuga*, previa adsorción de la actividad anti-M con hematíes M. Otros investigadores, como Guillot y Coulet (41), por el contrario, fallan en el intento de separar la actividad anti-A de la anti-B, en la lectina de *Hygrophorus hipothejus*, por adsorción sobre estromas de hematíes de los diferentes grupos.

Son numerosos los trabajos orientados al esclarecimiento del mecanismo de interacción fitohemaglutinina-hematíes, tratando de identificar los respectivos grupos receptores, así como su localización sobre la superficie del hematíe. Una forma de abordar el problema es el estudiar las variaciones en la aglutinabilidad de los hematíes, después de tratamientos enzimáticos diversos, o como en el caso de la lectina de *Robinia pseudo-accacia*, marcándola con I^{131}, y determinando el número de moléculas unidas (42). En este último caso se pudo comprobar que cada hematíe humano enlaza aproximadamente 210.000 moléculas de la lectina. Por tratamiento con neuraminidasa se incrementa la capacidad de enlace en un 50-60 por 100, mientras que la tripsina lo reduce en un 35 por 100, evidencia de que los grupos receptores se están eliminando con este tratamiento y podrán

ser recuperados de la solución enzimática. Efectivamente, se trata de un glicopéptido, el mismo que enlaza a las fitohemaglutininas del *Phaseolus vulgaris* y de *Lens sculenta*, con el grupo receptor en su porción oligosacárida, precisamente en los residuos de galactosa.

A veces se opera con los estromas de los hematíes, de los que se solubilizan sus componentes, por ejemplo, con Triton X-100, y aislamiento posterior por cromatografía de afinidad (43). De esta forma se ha comprobado que el receptor de alta afinidad para la concanavalina A está localizado en la fracción de la glicoproteína menor del hematíe, proteína esta responsable del transporte aniónico a través de la membrana en el hematíe, y que constituye, aproximadamente, el 25 por 100 de la proteína de la membrana. La lectina de *Lens culinaris*, por su parte, puede enlazarse, tanto a dicha glicoproteína como al componente mayor de sialoproteína.

La complejidad de los mecanismos del proceso de aglutinación de los hematíes por las fitohemaglutininas han sido estudiados con la concanavalina A, marcada en I^{125}, que permite determinar la magnitud del enlace, la velocidad de aglutinación, el efecto de la temperatura, etc. (44). Efectivamente, se ha podido comprobar, al igual que con la lectina de *Robinia*, que los puntos de enlace en el hematíe para la concanavalina A son de 120.000; que la velocidad de aglutinación, con bajas concentraciones de fitohemaglutinina, depende de la concentración, mientras que a altas concentraciones se alcanza un valor límite, que corresponde a la propia velocidad de agregación celular. En el primero de los casos, la aglutinación se está verificando, cuando sólo el 5 ó 7 por 100 de los receptores en el hematíe están ocupados por la lectina.

Modificaciones de la superficie de la membrana es uno de los factores que puede influir más profundamente en la aglutinabilidad; así, tanto el tratamiento con neuraminidasa como con tripsina o protamina, aumenta sensiblemente la aglutinabilidad por la concanavalina A. El efecto de la neuraminidasa es poco claro, ya que este tratamiento está eliminando una gran porción del ácido siálico, sin que por ello se modifique ni la velocidad ni la extensión del enlace de la concanavalina A, por lo que, tal vez, el aumento en la aglutinabilidad sea achacable a una disminución de la carga negativa superficial. La tripsinización, por su parte, elimina a los glicopéptidos, y puede apreciarse una disminución del 30 por 100 en la velocidad de

emigración electroforética, indicativo de una disminución paralela en la carga neta superficial. Otro tanto estará ocurriendo al enlazarse el policatión protamina, que neutralizará algunas de las cargas negativas superficiales.

Las características mecánicas del sistema pueden influir también, drásticamente, en el proceso de aglutinación, pues mientras la concanavalina A aglutina a los hematíes en reposo, deja de aglutinar si están en movimiento.

Unas determinadas características de fluidez en las membranas, que posibilite la movilidad de los receptores para la lectina, se considera, por algunos, como un requisito necesario para el proceso de aglutinación. En este caso, sin embargo, operando a 0° C, temperatura a la cual teóricamente habría inmovilización de los receptores, no se aprecia más que una reducción en la velocidad del proceso de aglutinación, sin que se afecte la magnitud de la misma. Estas experiencias excluyen también la intervención de cualquier proceso metabólico con consumo energético.

Otra forma de comprobar que la inmovilización de los receptores no está influyendo en la aglutinabilidad de los hematíes es mediante la fijación de la membrana con glutaraldehido (45). Esta fijación aumenta ligeramente la aglutinabilidad de los hematíes por la concanavalina A y por la fitohemaglutina de *Glycine max*, aunque la estabilidad de la aglutinación sea más pequeña. Se explica por el hecho de que la rigidez de la membrana, con pérdida de su plasticidad, hace que el área de contacto de los hematíes aglutinados sea más pequeña que en el caso de los no-fijados, alterándose así el número de moléculas de fitohemaglutininas capaces de formar puentes intercelulares efectivos. Este efecto puede comprobarse con aglutinaciones mixtas de hematíes fijados y no-fijados, con mayor estabilidad, dado que estos últimos pueden acoplarse perfectamente sobre la superficie de los fijados.

Ante la complejidad de los procesos de aglutinación que hemos venido estudiando, y las dificultades que entraña su estudio, en parte por la propia naturaleza de las membranas celulares, se abre camino en la actualidad un nuevo enfoque del problema a base del estudio de la interacción de la fitohemaglutinina, con modelos artificiales de membranas más o menos complicados. Se utilizan para ello liposomas (46, 47), a los que se incorporan sialoproteínas aisladas

de los hematíes, que se comportarán de manera similar a los propios hematíes. Los procesos de agregación por las fitohemaglutininas pueden ahora ser seguidos por las más adecuadas técnicas analíticas instrumentales, como son: microscopía electrónica, «light scattering» a 90° C, ultracentrifugación diferencial, isotopía radiactiva, etc.

En este terreno, y dado que el Prof. Otero y el Prof. Chantrez tienen desarrollada en toda su amplitud, la técnología de preparación y estudio de los liposomas, hemos iniciado una colaboración, de la que espero grandes frutos, para el estudio de los procesos de interacción de aquella fitohemaglutininas que más nos han interesado.

Interacción con linfocitos

Tal vez haya que considerar que la interacción fitohemaglutininas-linfocitos sea, junto a la de las células tumorales, de la que posteriormente trataremos, la más importante actividad biológica de las sustancias que nos ocupa, y de la que se han derivado técnicas analíticas de indudable interés.

Cuando a cultivos de linfocitos se le añaden ciertas fitohemaglutininas, se produce en ellos una transformación blástica, primera fase de un incremento en la actividad mitótica, que lleva a la división celular. Esta actividad mitótica de las fitohemaglutininas conduce a la síntesis de RNA y DNA, y a un gran número de procesos metabólicos anteriores a la división celular.

La actividad mitogénica de las fitohemaglutininas de los extractos se semillas no es una propiedad tan común como la aglutinante de hematíes, ya que escasamente la poseen un 10 por 100 de ellas.

Es indudable que la existencia de lectinas con estas propiedades ha hecho posible la considerable expansión de los estudios citogenéticos, y un mejor entendimiento de las relaciones entre ciertas anormalidades en los cromosomas y determinadas enfermedades. Por otra parte, la prueba más simple de conocer la respuesta de los linfocitos al estímulo de la fitohemaglutinina, la llamada prueba de transformación blástica, está resultando de la máxima importancia en la clínica, por la información que puede proporcionarnos respecto al sistema inmunitario del individuo.

La posibilidad del estímulo se medía, inicialmente, por contaje

al microscopio del porcentaje relativo de linfocitos que habían sufrido transformación blástica tras prolongada incubación con la lectina. Este método, que es solo semicuantitativo, está siendo reemplazado por otros, como el que mide la incorporación más o menos rápida de timidina o uridina, marcada radiactivamente, en el DNA o RNA, respectivo. El empleo de leucina tritiada permite detectar de manera más temprana la síntesis de proteínas, con lo que el resultado puede conocerse antes de las cuarenta y ocho horas (48). El ensayo clínico, de acuerdo con este último método, solo necesita de 5 a 10 cm^3 de sangre periférica, y el coeficiente de variación para ensayos por triplicado es del 10 al 15 por 100.

Otra técnica propuesta es la de citofluorimetría de flujo, con el uso de naranja de acridina, que tiñe en rojo fluorescente al RNA y en verde al DNA (49). Se opera por diferencia entre cultivos estimulados y no-estimulados, y sus resultados son concordantes con los de incorporación de timidina — C^{14}.

Establecida la existencia real de subpopulaciones de linfocitos dentro de los dos grupos, los B y los T, mucho se ha discutido respecto a cuáles de ellos podrían ser los responsables del proceso de transformación blástica por estímulo de la fitohemaglutinina.

Las técnicas de separación de las células sanguíneas por centrifugación con gradiente de densidad (Isopaque-Ficol) o electroforesis continua preparativa, permiten disponer de las diferentes subpopulaciones, sin apenas contaminación recíproca, lo que ha permitido llegar a conclusiones, en muchos casos definitiva, del tipo de células responsables de la estimulación, aun cuando queden todavía muchos aspectos del fenómeno, sin una explicación clara.

Efectivamente, las fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, *Lens sculenta* y concanavalina A, en solución, estimulan únicamente a los linfocitos T. Si el ensayo de estimulación se efectúa con la lectina del *Phaseolus*, inmovilizada sobre un lecho de Sepharosa, hay también estimulación efectiva de los linfocitos B (50). La concanavalina A, por su parte, si se inmoviliza en el fondo del propio disco de material plástico, donde se efectúa el cultivo, no estimula a los linfocitos T y sí a los B (51). Si se tiene en cuenta que cantidades similares de las lectinas citadas se están enlazando tanto a los linfocitos T como a los B, la no estimulación de alguno de ellos en los casos estudiados

habrá que achacarla a factores diferentes al simple enlace de la fitohemaglutinina sobre el linfocito.

Paralela con la transformación blástica, y subsiguiente mitosis, de los linfocitos T, por la estimulación con fitohemaglutinina, puede apreciarse una acción citotóxica, demostrable por la lisis de hematíes marcados con Cr^{51}. La centrifugación diferencial de los propios linfocitos T permite separar dos sub-populaciones, una responsable de las mitosis y otra responsable de la acción citotóxica (52).

Dado el papel que los linfocitos T están desempeñando en el sistema inmunitario a mediación celular, se quiere ver en la mayor o menor positividad de la prueba de transformación blástica por las fitohemaglutininas, un medio para conocer, con valor diagnóstico, deficiencias en nuestro sistema inmunitario. Así tenemos, que los linfocitos de pacientes con leucemia linfoide crónica, reaccionan muy débilmente al estímulo de la fitohemaglutinina, mientras que los de la leucemia linfoide aguda lo hacen muy fuertemente. Está muy aceptada la idea de una estrecha relación entre la enfermedad de Hodkkin con un defecto en el sistema inmunitario a mediación celular. Los ensayos efectuados con pacientes diagnosticados de Hodgkin, antes de recibir ningún tipo de tratamiento, muestran una respuesta linfocitaria significativamente reducida, en comparación con un grupo de control de 40 individuos sanos (53). No encuentran, sin embargo, ninguna correlación entre la respuesta cuantitativa de los linfocitos a la fitohemaglutinina, y el estado clínico, sintomatología e histopatolagía del paciente.

En el caso del *lupus eritematoso*, enfermedad de tipo autoinmune, las respuestas de los linfocitos de sangre periférica al estímulo de las fitohemaglutininas, en los individuos no tratados, eran significativamente más bajas, aunque para la prueba es necesario emplear cantidades de fitohemaglutininas inferiores a las que normalmente se consideran óptimas para el ensayo. Se ha comprobado, también, que en el plasma de estos enfermos existe una sustancia inhibidora de la respuesta estimulatoria en los linfocitos normales (54).

Demostrativo de la validez que el ensayo de transformación blástica puede tener en la valoración de la actividad de un medicamento está el caso de pacientes con hepatitis agresiva crónica, comprobada histológicamente, en los que se repiten los análisis al comienzo y en el transcurso de una terapéutica combinada inmuno-supresora, a base

de azathioprine-corticosteroide. Antes del tratamiento, la prueba de transformación blástica daba una respuesta significativamente reducida, mientras que durante el tratamiento se producía una normalización, o al menos, un aumento cuantitativo de la prueba de estimulación por la fitohemaglutinina. Suspendido el tratamiento, en el 66 por 100 de los individuos se observa de nuevo una baja respuesta, coincidente con una activación histológica del proceso, demostrable por biopsia; de aquí que se recomiende, en estos casos, una terapéutica prolongada, de al menos, varios años, para evitar cuando todavía es posible, el desarrollo de una cirrosis irreversible (55).

A los mismos resultados se llega en el tratamiento de la poliartritis crónica, con los citados medicamento (56).

Se sabía que la infección de un cultivo de linfocitos con virus de rubeola originaba una inhibición de los mismos al estímulo por las fitohemaglutininas.

En los ensayos *in vivo*, en niños sometidos a vacunación por virus atenuados, la actividad mitótica de los linfocitos declina seis días después de la vacunación; se hace mínima o nula a los once días, y vuelve a valores normales, e incluso superiores, a los veinte días, coincidiendo con la aparición de anticuerpos en el suero (57). Aun cuando los resultados confirman que la infección por rubeola origina un estado inmunodeprimido temporal, son muchas las partes que permanecen oscuras, como puede ser, la diferente respuesta según se trabaje con virus atenuados o no, o la posible relación de este fenómeno con la formación de anticuerpos.

Paralela a las investigaciones sobre las aplicaciones prácticas del proceso de transformación blástica de los linfocitos, son numerosos los trabajos encaminados a un mejor conocimiento de las bases teóricas por las que se rige el proceso.

Se conoce que a los pocos minutos de la estimulación por la fitohemaglutina se producen grandes cambios en los mecanismos de transporte y permeabilidad de la membrana, intercambiando con el medio, potasio, calcio, hexosas, aminoácidos, nucleótidos y fosfato inorgánico.

La mayor permeabilidad de la membrana debe estar jugando un papel muy importante en el proceso de activación, pues al modificarse la composición del contenido intracelular se puede estar afectando las actividades enzimáticas de tal forma que se inicien los procesos

de división celular. El empleo de compuestos marcados como fosfatos-P^{32}, colina-C^{14} y ácido oleico-C^{14} han permitido conocer los cambios que se producen en el metabolismo fosfolipídico de la membrana.

Los linfocitos tratados con lectinas incorporan P^{32}, en el fosfatidilinositol, más rápidamente que los no tratados. Su incorporación a otros fosfolípidos de mayor tamaño molecular, también se incrementa, pero el efecto es más tardío. Estos hechos se consideran de la máxima importancia, dada la íntima relación que existe entre el intercambio de fosfato en el fosfatidilinositol y numerosas funciones activas de la membrana (58, 59).

Otro de los mayores cambios que se observan en los fosfolípidos de las membranas es el recambio acelerado de sus restos de ácidos grasos, detectable a los diez minutos de incubación. A este tiempo puede verse que los microsomas de los linfocitos tratados con fitohemaglutininas incorporan tres veces más oleato-C^{14} en la lecitina que los microsomas de los controles (60, 61).

También se incrementa el metabolismo de las proteínas de la membrana, y se hace muy particularmente activo el recambio de glicoproteínas. Para el estudio de los receptores de las fitohemaglutininas sobre la membrana de los linfocitos, se siguen dos técnicas, la de fluorescencia, a base de lectinas marcadas con fluoresceína, y la microscopía electrónica, por enlace de la fitohemaglutinina con sustancias tales como, ferritina, hemocianina o bacteriófago, con gran densidad electrónica, y muy útiles, por tanto, como marcadores en la microscopía por transmisión.

El límite de resolución con las técnicas de fluorescencia está cercano a 1 μ, por lo que para una localización más precisa se deberá emplear la microscopía electrónica.

Con estos métodos se podrá conocer la localización y posibles cambios de los receptores en la superficie de la membrana, pero no lo que ocurre en su porción central, que debe ser estudiada por microscopía electrónica con agrietado por congelación. En esta técnica hay una tendencia a desdoblarse la membrana por un plano paralelo a su superficie, quedando visible su parte interior. Si se efectúa un ataque químico se podrán ver ahora los planos más internos de la membrana.

De los resultados analíticos hay evidencia clara de que la distribución de los receptores para las fitohemaglutininas, en la superficie de

los linfocitos, es difusa. Sin embargo, cuando se encuentran en presencia de algunas fitohemaglutininas, y a concentración adecuada, se induce una emigración de estos receptores hacia las zonas polares de la célula, fenómeno que se conoce como de formación de casquetes, perfectamente visibles en los ensayos de fluorescencia. Dicho fenófeno depende de la concentración de lectinas, pues, por ejemplo, para la concanavalina A, concentraciones por debajo de 5 $\mu g/cm^3$ inducen la formación de casquetes, mientras que a concentraciones más altas o con el empleo del derivado succínico de la concanavalina no es observable el fenómeno.

El proceso de redistribución parece ser análogo, al menos en sus efectos visibles, al que inducen los isoanticuerpos sobre los antígenos específicos superficiales, o la anti-inmunoglobulina sobre la inmunoglobulina que se encuentra unida a la membrana linfocitaria.

El comportamiento de las lectinas frente a este fenómeno es una muestra más de la complejidad de sus procesos de interacción y la gran variabilidad de sus propiedades biológicas.

Efectivamente, usando lectinas marcadas para análisis fluorescentes se ha hecho un estudio sobre linfocitos, a base de la medida de depolarización de la fluorescencia, que es indicativo de la mayor o menor inmovilización de la molécula fluorescente en el medio, en nuestro caso la membrana del linfocito. Con dichas medidas es posible fijar un índice cuantitativo desde O, que representa total inmovilización, a 1, que sería totalmente fluido.

En este estudio (63) la concanavalina A presenta un índice de 0.83, la lectina de *Glycine max* 0.43, y la del germen de trigo 0.37. Estos resultados son concordantes con la observación microscópica de formación de casquetes con la concanavalina A y ausencia de ellos en las otras dos.

En íntima relación con estos resultados sobre receptores más o menos inmovilizados, no podemos dejar de comentar unas experiencias que consideramos del máximo interés, por la conexión que tiene con temas de investigación de auténtica vanguardia.

Con el compuesto 1,6 difenil 1.3.5 hexatrieno (D. P. H.), que se une a los componentes lipídicos de la membrana celular, es posible realizar medidas de fluorescencia polarizada y deducir de ellas la microviscosidad del medio en el que se encuentra dicho marcador fluorescente.

Experiencias sobre linfocitos normales de ratas vienen a demostrar que su microviscosidad es casi dos veces mayor que la que corresponde a las células de un linfoma maligno, inducido en ratones por el virus Moloney (64).

Se ha podido comprobar que esta diferencia viene originada por el menor contenido en colesterol de la membrana de las células del linfoma, prácticamente la mitad del valor normal. La incorporación de colesterol a estas células, hasta llevarlo a sus valores normales, va acompañada de una marcada reducción en el poder cancerígeno de las mismas, demostrables por experiencias de transplantes tumorales (65).

Análogas diferencias en microviscosidad ha sido también observada entre los linfocitos humanos de sangre periférica de individuos normales, y aquellos procedentes de pacientes con leucemia linfoide crónica.

Cuando se trabaja con linfocitos en cultivo, estimulados unos con la fitohemaglutinina, concanavalina A, y otros de control sin fitohemaglutinina, las medidas correspondientes a la polarización de fluorescencia son indicativas de que la microviscosidad de los linfocitos estimulados era significativamente más baja que en los normales no-estimulados. Por otra parte, medidas seriadas a tiempo de incubación diferentes nos muestran que en los no estimulados hay un incremento progresivo en la viscosidad, con un valor máximo a las setenta y dos horas de cultivo, mientras que en los estimulados por la concanavalina A el incremento es mucho menor.

La microviscosidad está determinada principalmente por la relación de las concentraciones molares, colesterol/fosfolípido en la membrana, y para el sistema de marcador fluorescente DPH y temperatura de 25° C, se ha propuesto la siguiente fórmula empírica que selecciona estos valores (66).

$$\log \eta = 0{,}17 + 0{,}6 \frac{[\text{Colesterol}]}{[\text{Fosfolípido}]}$$

El incremento en la microviscosidad de los linfocitos no estimulados, según el tiempo de cultivo, se supone debido a un aumento del contenido en colesterol, que puede proceder de la incorporación del colesterol no esterificado del propio medio de cultivo (suero de ter-

nera) o de una biosíntesis del colesterol celular más acelerada. Lo que sí parece evidente es que a las setenta y dos horas de cultivo este cociente colesterol/fosfolípido, se hace 2,2 veces mayor, con el consiguiente aumento en la viscosidad, que pasa de 2,8 a 6 pois.

El aumento, considerablemente menor en la microviscosidad de los linfocitos en cultivo estimulados por la fitohemaglutinina, es debido a la presencia de las células blásticas procedentes de la transformación de los mismos, ya que para ellos el cociente colesterol/fosfolípido se hace aproximadamente 2,5 veces menor. Ahora bien, si tenemos en cuenta lo ya indicado de que en las primeras fases de la transformación linfoblástica hay un desarrollo marcado en la biosíntesis de los fosfolípidos, y que, además, la célula aumenta de tamaño, con incremento de dos veces su superficie, la disminución en el cociente colesterol/fosfolípido debe producirse sin que haya variación en el contenido inicial del colesterol en la célula.

Es evidente que la viscosidad de las membranas biológicas, es el parámetro físico más importante en el control de la movilidad rotacional y traslacional de las proteínas de la membrana. La menor viscosidad de las membranas de las células estimuladas por las fitohemaglutininas, explicaría la mayor movilidad de los receptores de las lectinas, lo que permitiría la formación de los casquetes ya citados, y otro tanto ocurriría con las enzimas, que al movilizarse pueden poner en marcha la síntesis del DNA, la transformación blástica y la posterior mitosis celular.

Se especula en la actualidad respecto a que una disminución controlada del cociente colesterol/fosfolípido en la membrana del linfocito puede constituir, al alcanzar una viscosidad determinada, la señal de alerta que ponga en marcha el sistema de respuesta inmune en los organismos vivos.

Basado en estos datos, resulta evidente que el cociente colesterol/fosfolípido, determinante de la viscosidad en la superficie de la membrana celular, está jugando un importante papel en el control de las actividades más diversas. Tal vez sería esta la hora de reivindicar a la molécula de colesterol, que tan mala prensa ha tenido durante años, pues ya hemos visto que en el lugar adecuado, y a la concentración debida, resulta vital para la correcta actividad celular y para control de los mecanismos de defensa.

Hay un hecho, al que se le ha prestado poca atención a la hora de

establecer los mecanismos de transformación linfoblástica, que es el fenómeno de la agregación de los linfocitos en el cultivo por la fitohemaglutinina, agregación que no ocurre de inmediato, sino que va progresando después de varias horas de cultivo. De acuerdo con los datos experimentales, esta unión célula-célula podría ser un requisito indispensable para la transformación blástica posterior, ya que dicha transformación no ocurre en células inmovilizadas sobre agar, y es muy abundante, sin embargo, en los cultivos densos, donde la interacción célula-célula es presumible que sea mayor.

En línea con esta hipótesis encontramos un trabajo en el que se comprueba que la clorpromazina, a dosis mayores de 0,005 mM inhibe totalmente la transformación blástica por estímulo de la concanavalina A, observándose también que no hay agregación celular. A esta concentración se comprueba que no tiene actividad citotóxica, ni que inhibe la síntesis del DNA, ya que si la adición al cultivo se hace pasadas las primeras veinticuatro horas de incubación, no se produce la inhibición de la transformación blástica ni la posterior mitosis celular.

Con el empleo de la concanavalina tritiada se comprueba también que la clorpromazina a las dosis inhibidoras no influye en el enlace de la fitohemaglutinina a la membrana, por lo que la hipótesis del contacto célula-célula, como necesario para la transformación, queda reforzada por estas experiencias en que la clorpromazina está impidiendo la agregación (67).

Otro aspecto interesante del proceso de activación de los linfocitos en cultivo por las fitohemaglutininas, lo constituye la segregación de unos factores llamados *linfokinas*, con una variada gama de propiedades biológicas, tanto *in vivo* como *in vitro*. Uno de los más importantes, y por ahora mejor caracterizado, es el factor inhibitorio de emigración de los macrófagos (MIF), que puede ser producido tanto por los linfocitos T como por los B.

Su importancia se deriva de sus aplicaciones al laboratorio clínico, ya que se ha comprobado que en algunos procesos que cursan como inmunodeficiencias pueden sus linfocitos ser capaces de efectuar transformaciones blásticas, pero que, sin embargo, fallan en la segregación del MIF. En la mayoría de los pacientes con enfermedades linfo-proliferativas (linfomas, Hodgkin) no aparece ese incremento en la segre-

gación del MIF, al ser estimulados sus linfocitos en cultivo por la concanavalina A (68).

Interacción con plaquetas

Son menos frecuentes los trabajos sobre la interacción de las lectinas sobre las plaquetas, tal vez por la dificultad que entraña el trabajar con estas células sanguíneas, dada su labilidad.

La función de las plaquetas durante la hemostasis está caracterizada por dos procesos interrelacionados:

a) Agregación plaquetaria.

b) Reacción de segregación de compuestos como nucleótidos de adenina, serotonina, proteínas, etc.

Con la trombina, por ejemplo, se pueden seguir ambos procesos en una suspensión de plaquetas humanas lavadas. A la proteína segregada por las plaquetas en estas condiciones se le denomina «proteína sensible a la trombina».

Entre la variedad de otros agentes capaces de provocar cualquiera de estos procesos, como el colágeno, ADP, complejos antígeno-anticuerpo, etc, hay que incluir a determinadas fitohemaglutininas.

Las fitohemaglutininas del *Phaseolus vulgaris*, por ejemplo, inhiben al enzima adenilato ciclasa e inducen la segregación de serotonina y de la proteína sensible a la trombina. Un ensayo cuantitativo de fijación de esta lectina a las plaquetas dan una cifra de 300.000 grupos receptores por célula, y glicoproteínas inhibidoras de la fijación, como puede ser la fetuína, anulan la segregación de la serotonina. Se sugiere, pues, que una determinada glicoproteína de la membrana plaquetaria podrá estar envuelta en el mecanismo de inducción del proceso de segregación (69).

En experimentos con otras lectinas se ha pretendido buscar alguna relación entre su actividad y el azúcar inhibidor determinante.

Así, la lectina de la soja *(Glycine max)* con determinante N-acetilgalactosamina, no tiene ningún efecto ni en la agregación plaquetaria ni en el proceso de segregación.

Lectinas con especificidad a la D-glucosa y D-manosa como son las del *Lathyrus sativus*, *Lens culinaris* y *Pisum sativum*, son de

efectos débiles, aun cuando a altas concentraciones pueden inducir la segregación de serotonina, pero no de ADP, lo que sugiere dos mecanismos diferentes para la segregación de ambos componentes.

Las de especificidad a la D-galactosa, especialmente la de *Ricinus communis* y N-acetilglucosamina,como la del germen de trigo, son muy activas, tanto para la segregación de ADP y serotonina como para la agregación plaquetaria. La fitohemaglutinina del *Phaseolus coccineus*, sin determinante conocido, es también muy activa.

La concanavalina A, incluida entre las de determinante de D-glucosa y D-manosa, se comporta de forma especial, ya que no es capaz de aglutinar a las células enteras, pero sí a las membranas aisladas, lo que puede ser indicativo de que los grupos receptores no se encuentran sobre la superficie exterior de la plaqueta, y que sólo se ponen al descubierto tras la rotura de la célula. El proceso de liberación de serotonina y ADP es ya muy efectivo a bajas concentraciones de la lectina (70).

Interacción con células tumorales

La primera información respecto a este tipo de interacción se remonta a 1963, en que Aub y cols. (71), trabajando con una preparación de lipasa procedente del germen de trigo, observaron que tenía una actividad aglutinante sobre células tumorales de ratón. Posteriormente se comprobó que dicha actividad procedía de la fitohemaglutinina que impurificaba a la preparación de lipasa y que además había una gran diferencia de comportamiento de dicha aglutinina, según que se tratase de células tumorales o células normales.

Ante este hallazgo de que una fitohemaglutinina supiese distinguir entre una célula tumoral y otra normal, los trabajos de investigación se multiplican, alentados con la posibilidad de obtener algún tipo de información sobre el mecanismo de transformación de la célula normal en cancerosa.

Hay un cierto predominio de los trabajos realizados con fibroblastos de ratones, transformados por virus-DNA cancerígenos. Con ellos se investiga la actividad aglutinante de diferentes lectinas, que de acuerdo con Lis y Sharon (72) puede expresarse por el llamado «factor de selectividad», que representa el cociente de la concentración

mínima de lectina necesaria para aglutinar a las células normales y la necesaria para aglutinar a las células transformadas.

Para fibroblastos transformados por el virus SV40 o el de polioma, los valores de factor de seletividad que figuran en la bibliografía suelen variar, lo que es explicable dado el material con el que se trabaja. Algunos de ellos se representan a continuación:

Fitohemaglutinina	Virus oncógeno	Factor selectividad
Germen de trigo	SV40	70 - 100
Germen de trigo	Polioma	30 - 70
Concanavalina A	SV40	15 - 32
Concanavalina A	Polioma	10
Glycine max	SV40	80
Glycine max	Polioma	40
Ricinus communis	SV40	50
Ricinus communis	Polioma	10
Phaseolus vulgaris	SV40	100
Lens culinaris	SV40	4
Vicia faba	SV40	8
Pisum sativum	SV40	8
Solanum tuberosum	SV40	16
Wistaria furibumda	SV40	16

También son activas frente a células tumorales diversas, la del *Abrus precatorius*, *Robinia pseudoaccacia*, *Sesanum indicum Momordia charantia*, etc.

Otras fitohemaglutininas, las procedentes del *Dolichos biflorus*, *Sophora japonica*, *Ulex europeus*, *Laburnum alpinum*, *Lotus tetragonólobus* y *Phaseolus lunatus*, son todas inactivas, y si nos fijamos que todas ellas tenían sus lectinas específicas para los hematíes de determinados grupos, podría considerare como válido el supuesto de que las lectinas grupo-específicas no interaccionan con las células somáticas en general.

Demostrada la unión de las fitohemaglutininas inespecíficas a las células tumorales se despertó de inmediato el interés por conocer sus efectos, tanto *in vitro*, con células en cultivo, como *in vivo*, control del desarrollo tumoral en animales de experimentación.

En cultivos de células de tejidos normales la velocidad de división

celular decrece, de manera general, cuando la población celular aumenta. La inhibición, que depende de la densidad de células en el medio, es un fenómeno reversible, como se demuestra por la restauración de la primitiva velocidad de división por sub-cultivos. Esta inhibición está ausente, o muy reducida, en los cultivos de células neoplásicas, en las cuales continúa su división, a su máxima velocidad, hasta que dichas células se necrosan.

La adición de concanavalina A a cultivos de células transformadas viralmente (virus de polioma) o químicamente (dimetil-nitrosamina), muestran una disminución efectiva del ritmo de división celular, en comparación con los cultivos controles sin fitohemaglutinina (73).

Al comprobarse que el efecto de la concanavalina A no se debe a una acción tóxica, y que además, el fenómeno es reversible, es decir, que al eluir la concanavalina A, recuperan las células tumorales el ritmo de división celular de los controles, se ha considerado que el efecto inmediato de la fitohemaglutinina es el de restaurar la facultad de «inhibición por contacto» del crecimiento celular, característico de las células normales y perdida en las transformadas (74).

Las experiencias *in vivo* (73) demostraron también que la inyección de 10 a 20 mg de concanavalina, en el lugar de la inoculación de las células tumorales, hacía que el 70 por 100 de los animales no presentaran tumoración pasados los treinta días de la implantación.

Nuestra aportación en este campo está representada por los trabajos efectuados en colaboración con la Dra. M.ª Rosa Otero (75), con las fitohemaglutininas de los extractos de semillas de *Myrtus communis*, sobre cáncer tipo Yoshida en rata (provocado por el agente cancerigeno, o aminoazotolueno). Como datos indicativos positivos de estas experiencias resaltaríamos que las fitohemaglutininas del *Myrtus* son capaces de disminuir el ritmo de crecimiento de la tumoración, y en unos porcentajes que van del 27 al 60 por 100, según las dosis y vías de administración de la fitohemaglutinina, paralizarlo con remisión total.

Muy intensa ha sido la actividad investigadora encaminada a resolver los problemas planteados al tratar de encontrar una clara explicación a los procesos de interacción fitohemaglutininas-células tumorales. El fenómeno, sin embargo, es tan complejo que muchas de sus partes permanecen oscuras, con conclusiones contradictorias, y

en general mal comprendidas. Nos haremos eco de aquellos aspectos más comprendidos y mejor elaborados.

Un aspecto muy importante de la reactividad de las fitohemaglutininas, es que un tratamiento enzimático suave con tripsina de fibroblastos normales, los hace presentar una aglutinabilidad semejante a la de las células transformadas. Se piensa, pues, que la aglutinabilidad frente a las fitohemaglutininas es una propiedad ya codificada en la célula y que el agente cancerígeno, al igual que ocurre con el tratamiento enzimático, se encarga de su activación.

Para que la aglutinación pueda verificarse, debe existir un enlace previo de la fitohemaglutinina con los correspondientes grupos receptores en la superficie de la membrana celular. Cabría pensarse que en la célula normal estos grupos receptores están enmascarados y sólo aparecen tras el tratamiento enzimático. Sin embargo, los ensayos cuantitativos con la concanavalina A marcada, han venido a demostrar que tanto las células normales como las transformadas por agencancerígenos o las tratadas por agentes proteolíticos, enlazan, aproximadamente, la misma cantidad de fitohemaglutinina.

Siendo esto así, se ha buscado la explicación en una localización diferente de los grupos receptores en ambos tipos de células.

Analíticamente puede seguirse el proceso por microscopía de fluorescencia, marcando con fluoresceína a la fitohemaglutinina, o por microscopía electrónica, previo marcaje, en este caso, de la fitohemaglutinina con ferritina, peroxidasa o por reacción con hemocianina.

Como característica casi general, aquellas células que no son aglutinables por las fitohemaglutininas, tiene a sus grupos receptores distribuidos uniformemente sobre la membrana, mientras que las aglutinables los tienen localizados de forma heterogénea, formando agrupaciones, de manera que al verificarse la aglutinación, las células entran en contacto por aquellas regiones donde la membrana tiene la más alta densidad de receptores.

Ante el hecho de que la aglutinabilidad de las células transformadas aparecía, en determinadas experiencias, dependientes de la temperatura, se planteaba la cuestión de si la distribución no uniforme de los grupos receptores existía con anterioridad a su enlace con la fitohemaglutinina, o era una consecuencia del propio enlace.

Nicolson (76) nos demuestra que operando a 0° C, la distribución de receptores es uniforme tanto en células normales como en las trans-

formadas, pero, que si la temperatura de incubación se eleva hasta 37° C, la uniformidad persiste en las células normales, mientras que en las transformadas se opera una agrupación de los receptores que hacen a la célula aglutinable.

Lo anterior es consecuente con la idea de presentar a las membranas celulares como unas estructuras fluidas, que permitirán una mayor o menor facilidad de movimiento a los grupos receptores, y que la modificación del grado de fluidez de la membrana sería una de las primeras manifestaciones del proceso de transformación celular por los agentes cancerígenos.

El mismo Nicolson presenta pruebas que parecen concluyentes. De unas células transformadas, incubadas a 0° C con fitohemaglutinina, se tomaban tres muestras, la primera se mantenía a 0° C, la segunda se trataba con formaldehído, al 2 por 100 durante quince minutos, y se incubaba posteriormente a 37° C, y la tercera se incubaba a 37° C: todas ellas se trataban posteriormente con una anti-fitohemaglutinina marcada para fluorescencia.

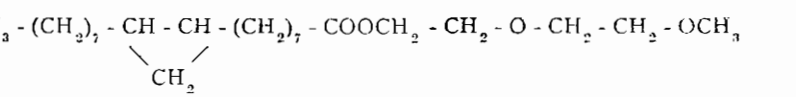
En la observación microscópica podría verse una distribución uniforme de los receptores en las dos primeras muestras, mientras que había agrupación de los mismos en la tercera. Se ve, pues, que la fijación de la estructura celular por el formaldehído o glutaraldehído, impide la movilización de los receptores, al igual que ocurre a la temperatura de 0° C.

En unas pruebas cuantitativas de fijación, tomando como indicador la pérdida de la aglutinabilidad celular, pudo verse que para células de linfoma, tratadas por glutaraldehído, al 2,5 por 100, se requería un tiempo de fijación de cuarenta y cinco minutos, para inhibir el efecto aglutinante de 100 $\mu g/cm^3$ de lectina del germen de trigo, tiempo que pasa a tres horas, si el ensayo se hace con la concanavalina A, o a seis horas, si la fitohemaglutinina procede de la *Glycine max* (77).

Las modificaciones de la fluidez de la membrana celular, como consecuencia de la acción de un agente cancerígeno, no sólo va a producirse en el sentido de aumentar, que ya hemos visto es lo más general, sino que también puede ocurrir lo contrario. Esto, al menos, es lo que se deduce de los resultados experimentales de las medidas de fluorescencia polarizada, con la concanavalina A-fluoresceína, en linfocitos normales y células de linfomas malignos, como representantes de aquellas células que, *in vivo*, no forman asociaciones en el

organismo, y fibroblastos normales y transformados por el virus SV40, de las que se asocian *in vivo* para formar tejidos. En las primeras de ellas la movilidad de los receptores de la concanavalina A disminuye con la transformación, lo que equivale a una disminución paralela de la fluidez; al contrario de las del segundo tipo de células, en las que la transformación va acompañada de un aumento de la fluidez (78).

Existen unos compuestos derivados del ciclopropano, que se conocen como agentes de movilidad de las membranas, en virtud de que su presencia hace aumentar la movilidad de los receptores de los anticuerpos Ig sobre la membrana de los linfocitos, promoviendo la formación de casquetes (79). Usando uno de estos compuestos, el denominado A_2C, se puede seguir la interacción de la aglutinina del germen de trigo con células de mastocitoma (80).



En este caso, la presencia de cantidades crecientes del A_2C en los cultivos origina la reagrupación en casquetes de los receptores de la aglutinina, a la vez que se va disminuyendo la aglutinabilidad de las células de mastocitoma. Se encuentra, pues, una cierta concordancia con el comportamiento que apuntábamos anteriormente en las células de plasmocitomas, ya que una modificación de la fluidez de la membrana, provocada artificialmente, lleva consigo una alteración de una de las características de estas células transformadas, su aglutinabilidad.

La complicación surge cuando en ensayos similares se emplea la concanavalina A, al observarse que el A_2C no modifica la localización de sus receptores. La inhibición de la aglutinación a baja temperatura puede ser enfocada, no solamente por estados de transición en las estructuras de las mebranas, originarios de cambios en viscosidad, sino también, por modificaciones del metabolismo celular.

En efecto, la presencia de inhibidores de los sistemas generadores de energía celular reduce la aglutinabilidad de las células de ascitis tumoral de ratas, por las fitohemaglutininas del *Ricinus communis* y la concanavalina A, sin que, por otra parte, se modifique la capacidad de enlace de las mismas (81).

La disminución en la aglutinabilidad iba acompañada de un des-

censo, más o menos pronunciado, del nivel de ATP intracelular. Yodoacetato y 2-doxiglucosa, que son fuertes inhibidores de la aglutinación, rebajan casi a cero el nivel de ATP, mientras que N_3Na, CNNa y 2,4 dinitrofenol, con efectos moderados sobre la aglutinación, hacían descender, más débilmente, el nivel del ATP.

Se sabe que las células generan ATP por dos vías diferentes, glicólisis y cadena respiratoria; si el inhibidor presente bloquea uno de los caminos, la célula seguiría siendo aglutinable. Así parece demostrarse con el 2,4 dinitrofenol, que al bloquear los dos caminos origina una progresiva disminución en la aglutinabilidad, de acuerdo con su concentración, de tal forma que cuando se hace 1 mM dejan de ser aglutinables. Sin embargo, si se añade glucosa al sistema, con objeto de mantener el nivel de ATP por vía glicolítica, la aglutinación persiste aun con concentraciones 5 mM del 2,4 dinitrofenol.

Parece evidente, de acuerdo con estas experiencias, que algún tipo de metabolismo celular activo por intermedio del ATP, es esencial para la aglutinación por estas fitohemaglutininas.

Otro compuesto, citochalasin B, conocido inhibidor de movimientos celulares (citokinesis, formación de microfibrillas, movimiento de receptores superficiales y traslocación de células completas) también inhibe la aglutinación, lo mismo que el colcemid, perturbador de la función microtubular. Luego todo aquello que modifique los procesos activos celulares, está influyendo de algún modo en la aglutinabilidad por las fitohemaglutininas.

Si como hemos venido comprobando, la aglutinabilidad por las fitohemaglutininas es una de las características de la transformación de la célula normal en cancerosa, los agentes anti-cancerígenos probados clínicamente útiles, podrían conducir a modificaciones de las membranas de las células tumorales, detectables por los ensayos de aglutinación.

Hwang y Sartorelli (82) utilizan células tumorales aisladas del fluido ascítico de Sarcoma 180, que se incuban con dosis diferentes de anticancerígenos, siguiendo la aglutinación cuantitativamente, por la variación de la absorbancia de la suspensión celular a 546 nm. Como fitohemaglutininas usan la del germen de trigo y la concanavalina A, operando a temperatura programada desde 0° a 37° C.

En esquema, los resultados obtenidos fueron: los compuestos 1-Tioguanidina y la Bleomicina inhiben la aglutinación por la agluti-

nina del germen de trigo, después de un tiempo de incubación de siete horas para la primera, y de 2,5 horas para la segunda. Con la concanavalina A se puede detectar el cambio progresivo en la membrana celular por efecto de la Bleomicina, al hacerse cada vez más pequeña la velocidad de aglutinación durante el período de incubación, efecto que se inicia a las dos horas y media. Chromomicina A_3, Adriamicina y Methotrexato, tienen efecto contrario a los anteriores, es decir, que después de siete horas de incubación para el primero, y sólo dos para los otros, la aglutinabilidad celular se incrementa. Independientemente de los motivos de este comportamiento dispar, lo que sí es evidente es que están reflejando unas modificaciones en la membrana celular, y a ello puede deberse la acción anticancerígena de estos compuestos.

Otros productos ensayados fueron, arabinosil-citosina, 5-fluorouracilo y 5-fluorodeoxiuridina, los cuales no afectan ni a la velocidad ni a la avidez de la aglutinación de las células del sarcoma-180, al menos en las condiciones experimentales usadas.

Ante estas experiencias, nosotros vislumbramos unas pruebas analíticas similares a los antibiógramas, a base de las células tumorales obtenidas por biopsia, y ensayo de la actividad agresora sobre sus membranas, de los diferentes agentes anticancerígenos de que se dispone, contrastada, como hemos visto, por su aglutinabilidad por las fitohemaglutininas.

Aspectos microbiológicos y parasitológicos

Aunque menos estudiado, no faltan tampoco trabajos con aporte de datos respecto a la interacción de fitohemaglutininas con bacterias, micoplasmas o virus.

Objeto de interés han sido, la interacción de la concanavalina A con los componentes de la pared celular del *Bacillus subtilis* (83), con algunas enterobacterias y con estreptococos.

Los experimentos con varias cepas de estreptococos orales y concanavalina A, vienen a mostrar tres modos diferentes de interacción. Con el *Strep sanguis*, cepa Blackburn, se produce agregación de los mismos, únicamente en presencia de saliva; se supone que la concanavalina A se une a las células, que se agruparán a través de puentes

de enlace facilitados por la saliva, probablemente un componente glicoproteico.

Con el *Strep sanguis*, cepa M7 PR3, no hay enlace concanavalina célula, pero sí hay agregación en presencia de la saliva. En este caso parece probable que la concanavalina A active, por algún mecanismo, el factor de agregación salivar.

El tercer modo de interacción lo presenta el *Strep mutans*, que no necesita del factor salivar para su agregación, pero sí de sacarosa.

Los autores del trabajo (84) postulan, que el hallazgo de estas interacciones con fitohemaglutininas aumentan las posibilidades de poder usarlas como medio para modificar el balance microbiano en la boca, por aclaramiento de las bacterias de la saliva.

Los micoplasmas, al estar desprovistos de pared celular, podrán interaccionar a través de su membrana citoplasmática, muy estable y elástica.

Las experiencias realizadas con una serie de micoplasmas y diversas fitohemaglutininas, son demostrativas de la especificidad de la interacción (85).

Las aglutinaciones pueden hacerse sobre placa, como si de hematíes se tratase, con la suspensión de los micoplasmas y las lectinas, con lectura a los dos minutos. Para la investigación de posibles aglutininas incompletas se puede probar también, en presencia de solución de albúmina bovina al 5 por 100.

Los extractos de *Lotus tetragonolobus*, *Dolichos biflorus*, *Marasmius oreades*, *Laburnum alpinum* y *Solanum tuberosum*, no aglutinan a ninguna de las especies de micoplasmas ensayados.

Resultados positivos dieron los extractos de *Ricinus communis* (RC), *Canavalia ensiformis* (CE), *Vicia cracca* (VC) y *Phaseolus vulgaris* (PHA), que resumidos fueron:

Micoplasma pneumoniae	es aglutinado por (RC), (CE)
Micoplasma neurolyticum	es aglutinado por (CE)
Micoplasma mycoides (var. *mycoides*).	es aglutinado por (RC), (CE)
Micoplasma pulmonis	es aglutinado por (VC), (RC), (PHA), (CE)
Micoplasma mycoides (var. *capri*) ...	es aglutinado por (VC), (RC), (PHA), (CE)
Micoplasma gallisepticum	es aglutinado por (VC), (RC), (PHA), (CE)
Micoplasma gallinarum	es aglutinado por (VC), (RC), (PHA), (CE)

La gran aglutinación del *M. pneumoniae* por (RC) y (CE), es indicativo de que unidades de galactosa y glucosa deben encontrarse

en la superficie de su membrana, presumiblemente unida a restos lipídicos, ya que la aglutinabilidad no se modifica por digestión de los micoplasmas por una proteasa. Idénticas consideraciones son aplicables al *M. mycoides* (var. *mycoide*), y a las restantes especies, en lo que a los receptores para (RC) y (CE), ya que la digestión con pronasa les hace no aglutinables por (VC) y (PHA); ello puede suponer que los receptores para estas fitohemaglutininas estén unidos a través de proteínas.

Respecto a los virus, ya hemos visto cómo las células transformadas por virus cancerígenos se hacen más aglutinables, propiedad que hay que hacerla extensiva a toda una serie de virus encapsidados no-oncogénicos, como puede ser: herpesvirus, poxvirus, arbovirus, paramixovirus y rhabdovirus.

Esta aglutinabilidad de las células se hace detectable dentro de las primeras doce horas de la infección viral, aunque no todas las células reaccionan igual ante un determinado virus. Así, los arbovirus no inducen aglutinabilidad en fibroblastos de embrión de pollo, pero sí lo hacen sobre células BHK, a pesar de que ambos tipos de células son capaces de producir grandes cantidades de virus.

Todos los virus encapsidados, por su parte, son aglutinados fuertemente por la concanavalina A, y en el caso concreto del virus de la enfermedad de Newcastle, es aglutinado igualmente por la fitohemaglutinina del germen de trigo (82).

Los virus de la influenza y el de estomatitis vesicular pueden ser aglutinados, tanto por la concanavalina A como por la fitohemaglutinina del germen de trigo y del *Ricinus communis*. La cantidad de estas aglutininas, que se unen a las partículas virales de influenza, presuponen que el número de receptores de la lectina sobre la superficie viral, se aproxima bastante al de agujas de glicoproteínas visibles en ésta por microscopía electrónica (87).

Hay también algunos estudios sobre la acción interferente de las fitohemaglutininas en los procesos antivirales del interferón. En estos ensayos se utiliza interferón unido a Sepharosa (IF-sepharosa), las fitohemaglutininas de *Phaseolus vulgaris*, *Lotus tetragonolobus* y concanavalina A, y como virus infectantes el encéfalo-miocarditis (EMC).

Con las fitohemaglutininas citadas se producía una marcada inhi-

bición del interferón, resultando inefectivas las de *Lens culinaris* y la del *Ulex europeus* (88).

Se comprobaba la actividad específica de la fitohemaglutinina porque, por ejemplo, la presencia en el medio de fetuina, una glicoproteína de alta selectividad para la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, dejaba sin efecto la acción interferente de esta última, y el IF-sepharosa recuparaba su plena actividad. La acción de L-fucosa, específica para la lectina de *Lotus*, no tenía, por el contrario, ningún efecto, lo que puede ser indicativo de un diferente mecanismo de interacción de esta fitohemaglutinina con el interferón.

En el terreno parasitológico podriamos destacar las interacciones de la concanavalina A con los trofozoitos de varias cepas de *Entamoeba histolytica* (89).

Se comprueba que a concentraciones de concanavalina A superiores a 100 $\mu g/cm^3$, los trofozoitos de las cepas patógenas HK9:NIH y HN2:IMSS, formaban grandes conglomerados constituídos por varios miles de células, mientras que los correspondientes a cepas obtenidas a partir de portadores asintomáticos, HM8:IMSS y HM7:IMSS, formaban agrupaciones de menos de diez células. Las aglutinaciones no se producían en presencia del azúcar α-metil-D-glucosa, inhibidor de la concanavalina, a concentración 0,1 M.

Los resultados hablan de una correlación entre el grado de aglutinación y la virulencia de los trofozoitos de la *E. histolitica*. Esta correlación no es general, pues con la *Acanthamoeba* el fenómeno se invierte, y ahora son las cepas virulentas, productoras de lesiones cerebrales a los humanos, las menos aglutinables por la concanavalina A (90).

La aglutinación es sensible a la temperatura, ya que se inhibe significativamente a temperaturas inferiores a los 15° C. Aunque ello puede ser debido a cambios de fluidez de la membrana, no puede tampoco descartarse algunas alteraciones metabólicas, por ejemplo, inhibición de algún enzima esencial para el proceso.

Los promastigotes de *Leishmania donovani* también aglutinan por la concanavalina A y por la fitohemaglutinina del *Phaseolus vulgaris* (91).

Las aglutinaciones observadas son del tipo somática-somática, flagelar-somática y flagelar-flagelar.

Tratamiento de los promastigotes por las enzimas dextranasa y

α-amilasa, reduce su capacidad para ser aglutinados por las lectinas, mientras que la tripsinización no tiene ningún efecto.

Estas interacciones permiten extender los conocimientos sobre los componentes de la membrana, con polisacáridos distribuidos al azar, portadores de residuos de α-D-glucosa y N-acetil-D-galactosamina.

Otros tipos de interacciones celulares

La aglutinación de espermatozoos por lectinas fue vista, en primer lugar, en los espermatozoos de toros (92), aglutinación que se verificaba cola con cola. Posteriormente las investigaciones se extendieron a los espermatozoos de otras especies animales, conociéndose en la actualidad la distribución de los receptores para diferentes lectinas, a lo largo del espermatozoo, y sus movilidades relativas, más alta en la región postacrosomal, que en la región del acrosoma y la cola (93).

En los óvulos, la interacción se verifica sobre la zona pellucida, con componentes mucoproteidos neutros o débilmente ácidos.

Para el caso de los óvulos de hamster, al ser tratados por la fitohemaglutinina del germen de trigo, no sólo se reduce al acoplamiento de los espermatozoos a la zona pellucida, sino que previene la penetración de los mismos. Este tratamiento incrementa las propiedades de «light scattering» de la superficie más externa de la zona pellucida, lo que sugiere que se producen cambios en la organización molecular de esta zona.

Estos efectos no parecen ser una propiedad general de todas las lectinas, sino que una vez más, se pone de manifiesto la alta especificidad de acción de estas sustancias. En efecto, la concanavalina A no bloquea completamente la fertilización del óvulo, mientras que son tan efectivas como la del germen de trigo, las fitohemaglutininas del *Ricinus communis* y la del *Dolichos biflorus*, que bloquean totalmente la fertilización (94).

Un trabajo muy interesante, el primero de este tipo, estudia las interacciones de las fitohemaglutininas, con células secretoras endocrinas, concretamente los Islotes de Langerhans aislados (95).

Comprueban la liberación de insulina y glucagón en presencia de 2 mM de glucosa.

De todas las fitohemaglutininas ensayadas, sólo dos estimulan la liberación de las hormonas, las del *Agaricus bisporus*, fracción B, y la del *Agaricus campestris*. No tenían efecto las de *Phaseolus vulgaris*, *Lens culinaris*, *Ricinus communis*, germen de trigo, *Glycine max*, *Dolichos biflorus*, *Solanum tuberosum* y concanavalina A.

Es muy significativo que esta liberación estimulada de las hormonas por las fitohemaglutininas sea un proceso que no requiere consumo de energía, ya que la presencia del 2-4 dinitrofenol no lo inhibe.

Se especula con que la interacción específica de las lectinas y sus receptores pueda conducir a cambios conformacionales en la estructura de la membrana de los islotes, facilitando así la exocitosis de las hormonas. Lo que no cabe duda es que las fitohemaglutininas constituyen unos elementos de ayuda poderosísimos para la investigación de los pasos finales del proceso de secreción hormonal.

También han sido objeto de estudio las interacciones con células retinianas y células intestinales, observándose diferencias según sean fetales o adultas.

Pasando al Reino Vegetal, nos referiremos únicamente al efecto estimulante de las lectinas en la germinación de los granos de polen (96).

La germinación del polen lleva consigo su paso a una célula metabólicamente activa, con rápido crecimiento del tubo polínico, proceso que puede ser seguido microscópicamente.

Los ensayos con fitohemaglutinina del *Phaseolus vulgaris* y la concanavalina A, frente a granos de polen del *Lilium longiflorum*, demuestran que con una concentración de lectina en el medio de 1 mg/cm^3, el mayor porcentaje de granos germinados se alcanza durante la primera hora, frente a tres horas para los controles. Si la concentración se rebaja a 100 µg/cm^3, el máximo ocurre a las dos horas. y si la concentración es de 10 µg/cm^3, no se encuentra diferencia con los controles. El efecto de la lectina es, pues, sobre la velocidad de germinación, y no sobre el porcentaje de granos germinados. Una explicación lógica, pero no demostrada, es la de que la unión de la lectina a la pared celular puede alterar la permeabilidad de la membrana, facilitando así el paso del agua y otros elementos nutrientes para la germinación.

Interacción con macromoléculas en solución o dispersión

Al igual que se unen a receptores moleculares sobre membranas pueden hacerlo con las macromoléculas en solución, lo que origina, en muchos casos, la formación de precipitados.

Para que ésta sea posible, la fitohemaglutinina debe tener, al menos, dos puntos de enlace en su molécula, como es el caso de metil-α-D-manopiranosa y metil-α-D-glucopiranosa, en la concanavalina A, dos N-acetil-D-galactosamina en la de *Glycine max*, o dos o cuatro L-fucosa, en la del *Lotus tetragonolobus*. Parece demostrado que estos puntos de enlace son homogéneos e idénticos en cuanto a su distribución, propiedad que les distingue de los anticuerpos, en los que falta esta identidad y homogeneidad.

No es de extrañar, que la diversidad en la composición química de las fitohemaglutininas, sea origen de una gran variabilidad de comportamiento frente a las macromoléculas.

Atención especial se ha prestado a las interacciones con los componentes del suero humano tanto normales como patológicos, y así, por ejemplo, con la concanavalina A se obtiene un precipitado en el que puede demostrarse la presencia de los siguientes componentes: IgM, IgA, α_1-antitripsina, α_2-macroglobulina, transferrina, β_3-lipoproteínas, haptoglobinas, ceruloplasmina, componentes grupo-espe-específicos y complemento (97).

Con las fitohemaglutininas de *Lens culinaris* se obtiene igualmente un precipitado que contiene IgM, α_2-macroglobulina y β_2-glicoproteína, así como trazas de IgA e IgH (98).

Frente al antígeno Australia, marcado con I^{125}, la concanavalina A lo precipita en un 25 por 100, y la parte soluble también forma algún tipo de agregado molecular, ya que la movilidad electroforética de dicho antígeno se reduce drásticamente (99).

Las fitohemaglutininas del *Myrtus communis* interaccionan fuertemente con los componentes del suero humano, muy especialmente con la fracción lipoproteica, aunque también, según el pH del medio, puede producirse la precipitación, casi completa, de las fracciones globulínicas α, β y γ. La albúmina puede permanecer en solución, aun cuando el aumento en su velocidad de emigración electroforética es indicativo de algún tipo de proceso de interacción (100). Con frac-

ciones proteicas separadas, por ejemplo, la lipoproteína de baja densidad (LDL) interacciona con la concanavalina A y no con la ricina. El proceso se seguía, en este caso, por la inhibición del poder aglutinante de la lectina sobre hematíes de conejo, en presencia de la lipoproteína (101). También se enlaza la concanavalina A a la trombina, con inhibición de su acción coagulante sobre el plasma humano o sobre el fibrinógeno (102).

Por técnicas de difusión en agar pueden seguirse las interacciones de los componentes de la saliva humana, con los extractos de *Cytisus sessilifolius*, *Laburnum alpinum*, *Ulex europeaus* y *Lotus tetragonolobus*, observándose diferentes líneas de precipitación, según que los individuos fuesen secretores o no-secretores (103).

La mielina purificada, en suspensión en «buffer» de fosfato, es aglutinada por la concanavalina A, no siendo afectada por las fitohemaglutininas del *Phaseolus vulgaris*, *Ulex europaeus* o *Lotus tetragonolobus* (104).

Estas interacciones de las fitohemaglutininas ha despertado un gran interés en el terreno de las investigaciones sobre técnicas de separación basadas en las cromatografías de afinidad. Hoy día es posible obtener, comercializados con nombres diferentes, soportes para este tipo de cromatografía con diferentes lectinas inmovilizadas sobre ellos, con las que se podrán obtener fracciones proteicas del suero (105), fracciones lipoproteicas (106), enzimas purificados (107), componentes glicoproteidos de los virus (108), hormonas, etc. Con las fitohemaglutininas del *Myrtus communis*, inmovilizadas sobre los hematíes tratados con glutaraldehído se dispone también de un sistema de afinidad capaz de enlazar a componentes del suero humano, muy especialmente a la fracción lipídica. Sus posibilidades selectivas, sistemas eluyentes, etc., están siendo estudiadas en la actualidad, en colaboración con la Srta. Ródenas, y los resultados son muy esperanzadores.

Posibilidades en terapéutica y en la profilaxis

Las posibles acciones terapéuticas de las fitohemaglutininas que en virtud de las propiedades biológicas anteriormente citadas pueden derivarse, es un campo por explorar.

Algunos ensayos se han hecho relacionados con la interacción con las células cancerosas, para el tratamiento, en animales de experimentación, del sarcoma 180. Se comparan los efectos de quimioterápicos, radiaciones y fitohemaglutinina del *Phaseolus vulgaris*, bien independientemente o asociados.

Los resultados muestran que no hay diferencias entre los tratamientos independientes y los animales de control. Combinando los tres tratamientos en secuencias diferentes se conseguía prolongar significativamente el tiempo de vida, en el 90 por 100 de los animales, con una disminución manifiesta del volumen de la masa tumoral, en el 50 por 100 de los casos.

Las secuencias más efectivas fueron:

1.ª Fitohemaglutinina-rayos X-ciclosfosfamida.
2.ª Fitohemaglutinina-ciclofosfamida-rayos X.

La administración de los quimioterápicos y la fitohemaglutinina se hacía intraperitonealmente (109).

En otro trabajo (110) se estudia el efecto de la concanavalina A y la fitohemaglutinina del *Phaseolus vulgaris* sobre la leucemia inducida por el virus de Friend. Se demuestra que ambas lectinas disminuyen la mortalidad, sin que se conozca, de manera clara, sus mecanismos de acción.

Un gran porcentaje de animales sobrevivía a la inyección del virus, si este había sido incubado con las lectinas. El efecto protector era 40 veces mayor con la concanavalina A que con la lectina del *Phaseolus*.

Se comprobaba que el efecto inhibitorio era debido a la interacción fitohemaglutinina-virus, porque la administración simultánea de ambos, pero en inyecciones separadas, no tenía efecto inhibitorio.

La observación más importante tal vez sea el hecho comprobado de que el virus incubado con la concanavalina A mantiene su poder antigénico, ya que se alcanza una inmunidad completa en los dos tercios de los animales tratados por una sola inyección del virus incubado. Efectivamente, sesenta días después de esta inyección, los animales eran inmunes a la subsiguiente administración de dosis letales de virus de Friend.

Siendo muy numerosas las especies vegetales que contienen fitohemaglutininas y que forman parte de las dietas alimenticias más

usuales (judías, lentejas, guisantes, habas, patatas, etc.) se especula sobre sus posibles acciones biológicas tanto en la mucosa bucal (aclaramiento de gérmenes) como en el tracto digestivo.

Nosotros nos hemos preocupado por este problema, y al estudiar las fitohemaglutininas de semillas comestibles (111) y las de la patata (20), se determinaba su estabilidad a los procesos de cocinado, por la variación de sus títulos aglutinantes frente a hematíes humanos. En muchos casos la inactivación era total, pero en otros, como en la patata, había variedades con alta resistencia a la temperatura.

De cualquier forma, la pérdida de su actividad aglutinante no es demostrativo, salvo que expresamente se compruebe, de que su inactivación es total para cualquiera de las otras propiedades biológicas.

Freed y Green (112) hacen responsables en parte, a las fitohemaglutininas, de los conocidos efectos fisiológicos que se producen tras la abundante ingestión de judías: incremento en la motilidad intestinal y producción de moco y gases. Consideran que de esta forma, no sólo protegen al organismo de su toxicidad, sino que también lo están protegiendo contra el cáncer intestinal por vías diferentes:

1.º Se causaría inflamación, con aumento en la producción de moco y aumento del bolo fecal, con lo que se facilita la eliminación de células malignas y cancerígenas.

2.º Las lectinas se estarían uniendo a las células de la mucosa, induciendo mitosis e incrementando el recambio epitelial, dando así menos oportunidades para que una célula neoplásica pueda implantarse.

3.º Un proceso similar al anterior podría estimular a los linfocitos locales, no específicamente, a aumentar su citotoxicidad frente a las células cancerígenas.

4.º Las mismas células cancerosas serían susceptibles a un ataque directo por la lectinas.

De confirmarse esta teoría, no cabe duda que la ingestión de las fitohemaglutininas más apropiadas sería la mejor de las técnicas profilácticas contra el cáncer de colon. De manera similar, y bajo forma de aerosoles, protegería contra el cáncer bronquial.

* * *

Hemos visto, en el breve tiempo de esta lectura, que unas sustancias, las fitohemaglutininas, que nacieron como una simple curiosidad científica, se han convertido hoy, gracias al tesón de tantos y tantos investigadores, en esta espléndida realidad, con logros consolidados tales como: su empleo como medio de control en la tipificación de determinados grupos sanguíneos; su utilización en los cultivos de linfocitos, para el estudio de cromosomas; su aportación en los análisis clínicos en las pruebas de transformación blástica, de tan indudable interés en aquellas enfermedades que tienen por origen alteraciones del sistema inmunitario; su gran ayuda en los estudios teóricos de las transformaciones celulares, a nivel de membrana, causadas por agentes cancerígenos virógenos o químicos, y su utilización como medios ideales de separación de macromoléculas en las modernas técnicas de cromatografía de afinidad.

¿Qué nuevas sorpresas nos tienen todavía reservadas estas sustancias?

Somos muy optimistas a la vista del gran número de investigadores de los más diversos campos, que dedican sus afanes al estudio de estas sustancias, porque creen en sus posibilidades.

Habrá que estar pendiente de lo que nos traiga la literatura científica en un próximo futuro.

He dicho.

BIBLIOGRAFÍA

(1) BOYD, W. C.: «Vox Sang.», 8, 1-32, 1963.

(2) RENKONEN, K. O.: «Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.», 26, 68, 1948.

(3) BOYD, W. C., REGUERA, R. M.: «J. Immunol.», 62, 333, 1949.

(4) TEALE, F. W. J.: «Biochem. J.», 76, 381-388, 1960.

(5) MILLER, J. N., NWOKEDI, G. I. C.: «Biochim. Biophys. Acta», 393, 426-34, 1975.

(6) GUNTHER, G. R., WANG, J. L., YAHORA, IL., CUNNINGHAM, B. A., EDELMAN, G. M.: «Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.», 70, 1012, 1973.

(7) FELSTED, R. L., LEAVITT, R. D., BACHURD, N. R.: «Biochim. Biophys. Acta», 405 72-81, 1975.

(8) NOWAKOVÁ, N., KOCOUREK, J.: «Biochim. Biophys. Acta», 359, 320-333, 1974.

(9) FLIEGEROVÁ, O., SALVETOVÁ, A., TICHÁ, M., KOCOUREK, J.: «Biochim. Biophys. Acta», 351, 416-26, 1974.

(10) FIALOVÁ, D., TICHÁ, M., KOCOUREK, J.: «Biochim. Biophys. Acta», 393, 170-181, 1975.
(11) TROWBRIDGE, I. S.: «J. Biol. Chem.», 18, 6004-12, 1974.
(12) PRIVAT, J. P., DELMOTTE, F., MIALONIER, G., BONCHARD, P., MONSIGNY, M.: «Eur. J. Biochem.», 47, 5-14, 1974.
(13) OLSNES, S., SALTVEDT, E., PIHL, A.: «J. Biol. Chem.», 3, 803-810, 1974.
(14) WEL, C. H., KOH, C., PFUDERER, P., EINSTEIN, J. R.: «J. Biol. Chem.», 250, 4790-4795, 1975
(15) CARTER, W. Y., ETZLER, M. E.: «J. Biol. Chem.», 7, 2756-2762, 1975.
(16) PRIGENT, M. J., BOURRILLON, R.: «Biochim. Biophys. Acta», 420, 112-121, 1976.
(17) HAYES, C. E., GOLSTEIN, I. J.: «J. Biol. Chem.», 6, 1904-1914, 1974.
(18) PACÁDK, F. y KOCOUREK, J.: «Biochim. Biophys. Acta», 400, 374-386, 1975.
(19) ALLEN, A. K., NEUBERGER, A.: 135, 307-314, 1973.
(20) ORTEGA, M., GONZÁLEZ, M. T.: «Anales Bromatología», 12, 353-375, 1970.
(21) RÓDENAS, S.: Tesis Doctoral (pendiente).
(22) JONES, D A.: «Vox Sang.», 6, 502-505, 1961.
(23) CLARKE, A. E., KNOX, R. B., JERMYN, M. A.: «J. Cell. Sci», 19, 157-167, 1975.
(24) JANZEU, D. H., JUSTER, H. B., LIENER, I. E.: «Science», 192, 795-796, 1976.
(25) BOHLOOL, B. B., SCHMIDT, E. L.: «Science», 185, 269-271, 1974.
(26) RONGÉ, M. P.: «C. R. Acad. Sc. Paris», 280, serie D, 21-24, 1975.
(27) GUILLOT, J., SCANDARIATO, M., COULET, M.: «Ann. Microbiol.», (Inst. Pasteur»), 125B, 489-500, 1974.
(28) WATSON, L., KNOX, R. B., CREASER, E. H.: «Nature», 249, 574-576, 1974.
(29) RENKONEN, K. O.: «Ann. Med. Exp. Fenn.», 28, 45-51, 1950.
(30) BOYD, W. G, REGUERA, R M.: «J. Inmunol.», 63, 333, 1949.
(31) CAZAL, M , LALAURIE, M.: «Acta haemat.», 8, 73, 1952.
(32) BIRD, G. W. G.: «A. M. C. Journal», 11, 17, 1955.
(33) OTTENSOOSER, F., SILBERSCHMIDT, K.: «Nature», 172, 914, 1953.
(34) MÄKELÄ, O., MÄKELÄ, P.: «Ann. Med. Exp. Fenn.», 34, 402-404, 1956.
(35) ORTEGA, M., FERNÁNDEZ-GALIANO, E.: «Ann. Real Acad. Farm.», 6, 421-446, 1962.
(36) ORTEGA, M., LÓPEZ-DOLARA, A.: «Ann. Inst. Bot. Cavanilles», 237-251, 1965.
(37) ORTEGA, M., LÓPEZ-DOLARA, A.: «Sangre», 10, 337-46, 1965.
(38) WATKINS, W. M., MORGAN, W. T. J.: «Nature», 169, 825, 1952.
(39) BIRD, G. W. G., WINGHAM, J.: «Vox Sang.», 26, 163-166, 1974.
(40) MOON, G. J., WIENER, A. S.: «Vox Sang.», 26, 167-170, 1974.
(41) GUILLOT, J., COULET, M.: «Rev. Fran. Transfusión», 1, 49-57, 1974.
(42) LESENEY, A. M., BURRILLON, R., KORNFELD, S.: «Arch. Biochim. Biophys.», 153, 831-36, 1972.
(43) FINDLAY, J. B. C.: «J. Biol. Chem.», 249, 4398-4403, 1974.
(44) SCHNEBLI, H. P., BÄCHI, T.: «Exptl. Cell. Res.», 91, 175-183, 1975.
(45) MARGUARDT, M. D., GORDON, J. A.: «Exptl. Cell. Res.», 91, 310-316, 1975.
(46) REDWOOD, W. R., JANSONS, V. K., PATEL, B. C.: «Biochim. Biophys. Acta», 406, 347-361, 1975.

(47) SUROLIA, A., BACHHAWAT, B. K., PODDER, S. L.: «Nature», 257, 802-804, 1975.
(48) CURTET, C., LÉ MEVEL, B. P.: «Biomedicine», 24, 334-339, 1976.
(49) BRANNSTEN, J. D., MELAME, M. R., SHARPLESS, T. K., HANSEN, J. A., DUPONT, B., GOOD, R. A.: «Clin. Imm. and Immunopathol.», 5, 326-332, 1976.
(50) GREAVES, M. F., BAUMINGER, S.: «Nature New. Biol.», 235, 67, 1972.
(51) ANDERSON, J., EDELMAN, G. M., MÖLLER, G., SJÖBERG, O.: «Eur. J. Immunol.», 2, 233, 1972.
(52) DAWKINS, R L., ZILKO, P. J.: «Nature», 254, 144-145, 1975.
(53) JANG, J. M., OBERLING, F., BIGEL, P., MAYOR, S., WAITZ, R.: «Biomedicine», 21, 372-377, 1974.
(54) MALAVÉ, I., LAYRISSE, Z., LAYRISSE, M.: «Cell. Immunol.», 15, 231-236, 1975.
(55) PAPPAS, A., VON SEEBACH, H. B., SCHWARZE, G., REIKOWSKI, H., JOST, H., JUNG, M., SCHEURLEU, P. G.: «Beitr. Path. Bd.», 156, 197-207, 1975.
(56) DENMAN, E. J., DENMAN, A. M., GREENWOOD, B. M., GALL, D., HEATH, R. B.: «Ann. Rheum. Dis.», 29, 220-231, 1970.
(57) MCMORROW, L. E., VESIKARI, T., WOLMAN, S. R., GILES, J. P., COOPER, L. Z.: «J. Infec. Dis.», 130, 464-69, 1974.
(58) LUCAS, D. O., SHOHET, S. B., MERLER, E.: «J. Immunol.», 106, 768, 1971.
(59) FISHER, D. B., MUELLER, G. C.: «Biochim. Biophys. Acta», 176, 316, 1969.
(60) RESCH, K., FERBER, E., ODENTHAL, J., FISCHER, H.: «Eur. J. Immunol.», 1, 162, 1971.
(61) RESCH, K., GELFAND, E. W., HANSEN, K., FERBER, E.: «Eur. J. Immunol.», 2, 598, 1972.
(62) SCHMIDT-ULLRICH, R., WALLACH, D. F. H., FERBER, E.: «Biochim. Biophys. Acta», 356, 288, 1974.
(63) SHINTZKY, M., INBAR, M., SACHS, L.: «Febs Lett.», 2, 247-250, 1973.
(64) SHINITZKY, M., INBAR, M.: «J. Mol. Biol.», 85, 603, 1974.
(65) INBAR, M., SHINITZKY, M.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 71, 2128, 1974.
(66) INBAR, M., SHINITZKY, M.: «Eur. J. Immunol.», 5, 166-170, 1975.
(67) FERGUSON, R. M., SCHMIDTKE, J. R., SIMMONS, R. L.: «Nature», 256, 744-745, 1975
(68) GORSKI, A. J., DUPONT, B., HANSEN, J. H., GOOD, R. A.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.», 72, 3197-3200, 1975.
(69) TOLLEFSEN, D. M., FEAGLER, J. R., MAJERUS, P. W.: «J. Clin. Investigation», 53, 211-218, 1974.
(70) GREENBERG, J. H., JAMIESON, G. A.: «Biochim. Biophys. Acta», 345, 231-242, 1974.
(71) AUB, J. C., TIESLAU, C., LANKESTER, A.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.), 50, 613, 1963.
(72) LIS, H., SHARON, N.: «Annu. Rev. Biochem.», 42, 541, 1973.
(73) SHOHAM, Y., INBAR, M., SACHS, L.: «Nature», 227, 1244-1246, 1970.
(74) BURGER, M. M., NOONAN, K. D.: «Nature», 228, 512-515, 1970.
(75) ORTEGA, M., OTERO, M. R.: «Unifarma», V, 224-236, 1975.

(76) NICOLSON, G. L.: «Nature New Biol.», 243, 218-220, 1973.
(77) INBAR, M., HUET, CH., OSERROFF, A. R., BEN-BASSAT, H., SACHS, L.: «Biochim. Biophys. Acta», 311, 594-599, 1973.
(78) INBAR, M., SHINITZKY, M., SACHS, L.: «J. Mol. Biol.», 81, 245-253, 1973.
(79) KOSOWER, E. M., KOSOWER, N. S., FALTIN, Z., DIVER, A., SALTOUN, G., FRENSDORF, A.: «Biochim. Biophys. Acta», 363, 261-265, 1974.
(80) LUSTIG, S., PLUZNIK, D. H., KOSOWER, N. S., KOSOWER, E. M.: «Biochim. Biophys. Acta», 401, 458-467, 1975.
(81) KANEKO, I., HAYASTSU, H., SATOH, H., UKITA, T.: «Biochim. Biophys. Acta», 411, 334-348, 1975.
(82) HWANG, K. M., SARTORELLI, A. C.: «Biochem. Pharmacol.», 24, 1149-1152, 1975.
(83) DOYLE, R. J., BIRDSELL, D. C.: «J. Bacteriol.», 109, 652-658, 1972.
(84) KASHKET, S., GUILMETTE, K. M.: «Archs. Oral. Biol.», 20, 375-379, 1975.
(85) SCHIEFER, H. G., GERHARDT, U., BRUNNER, H., KRÜPE, M.: «J. Bacteriol.», 120, 81-88, 1974
(86) POSTE, G., REEVE, P.: «Nature. New Biol.», 237, 113, 1972.
(87) PEUHOET, E., OLSEN, CH., CÄARLSON, S., LACORBIER, M., NICOLSON, G. L.: «Biochem», 17, 3561-3566, 1974.
(88) BESANÇON, F., ANKEL, H.: «Nature», 250, 784-786, 1974.
(89) MARTÍNEZ, A., GONZÁLEZ, A., DE LA TORRE, M.: «Arch. Invest. Med.», 4, 39-48, 1973.
(90) STEVENS, A. R., KAUFMAN, A. E.: «Nature», 242, 43-45, 1974.
(91) DWYER, D. M.: «Science», 184, 471-473, 1974.
(92) KASHIWABARA, T., TANAKA, R., MATSUMOTO, T.: «Nature», 207, 831-832, 1965.
(93) NICOLSON, G. L., YANAGIMACHI, R.: «Science», 184, 1294-1296, 1974.
(94) OIKAWA, T., YANAGIMACHI, R., NICOLSON, G. L.: «Nature», 241, 256-259, 1973
(95) EWART, R. B. L., KORNFELD, S., KIPNIS, D. M.: «Diabetes», 8, 705-714, 1975.
(96) SOUTHWORTH, D.: «Nature», 258, 600-601, 1975.
(97) LEÓN, M. A.: «Science», 158, 1325, 1967.
(98) MARTÍN, N., LEÓN, M. A., TAKAHASHÍ, T., TOWAR, I. K., SAGE, H. J.: «J. Biol. Chem.», 246, 1596-1601, 1971.
(99) CAWLEY, L. P.: «Ann. J. Clin. Pathol.», 57, 2, 1972.
(100) ORTEGA, M., ABEGER, A.: «Ciencia Ind. Farm.», 4, 103-111, 1976.
(101) HARMONY, J. A. K., CORDES, E. H.: «J. Biol. Chem.», 250, 8614-8617, 1975.
(102) KARPATKIN, S., KARPATKIN, M.: «Biochem. Biophys. Research Comm.», 57, 1111-1118, 1974.
(103) GRUNDBACHER, F. J.: «Science», 181, 461-463, 1973.
(104) MATTEHIEU, J. M., DANIEL, A., QUARLES, R. H., BRADY, R. O.: «Brain Res.», 81, 348-343, 1974.
(105) ERSSON, B., PORATH, J.: «Febs. Letter», 48, 126-129, 1974.
(106) MCCONATHY, W. Y., ALNPOVIC, P.: «Febs Lett.», 41, 174-177, 1974.
(107) RUSH, R. A., THOMAS, P. E., KINDLER, S. H.: «Biochem. Biophys. Research Comm.», 57, 1301-1305, 1974.

(108) HAYMAN, M. J., SKEHEL, J. J., CRUMPTON, M. J.: «Febs Lett.», 29, 185-188, 1973.
(109) ROBINSON, E., MEKORI, T.: «Exp. J. Cancer», 9, 125-131, 1973.
(110) DENT, P. B.: «J. Nat. Cancer Inst.», 50, 511-513, 1973.
(111) ORTEGA, M., CARDONA, A.: «Anales Bromatología», XVIII, 327-51, 1966.
(112) FREED, D. L., GREEN, F. H. Y.: «Lancet», 1261-1262, 1975.

DISCURSO
DE
CONTESTACION

POR EL ACADÉMICO DE NÚMERO
EXCMO. SR. D. ENRIQUE OTERO
AENLLE.

Excmo. Sr. Director.
Excmos. Sres Académicos.
Señoras y Señores.

Al alto honor que supone representar a la Real Academia de Farmacia en cualquier momento, se une, en esta ocasión, un hondo sentimiento de grata complacencia, pues ello me permitirá expresar, de viva voz, algunos de los conceptos que corresponden a mi admiración y entrañable amistad con el Prof. Ortega Mata y a su trayectoria científica, y que, sintiéndolos profundamente, quedan, en la mayoría de los casos, velados por el recato propio de cada situación.

Cuando en la Cátedra de Técnica Física y Físico-Química que regentaba el inolvidable Dr. Portillo, alternando con las tareas docentes que comportaba nuestra condición de Profesor Auxiliar, realizábamos, también, algunas investigaciones necesarias para preparar las Oposiciones a la Cátedra de Físico-Química de la Facultad de Santiago, tuvimos el placer de distinguir entre nuestros alumnos a un joven de aspecto espigado, sencillo, correcto, pero brillante en sus exposiciones, y riguroso en la metodología de Laboratorio. Deseando contar en seguida con su ayuda inmediata, le incorporamos, sin dudarlo, a nuestro equipo de trabajo, ya que presentaba, además, unas perspectivas claras de vocación docente, confirmadas más tarde, en toda su plenitud, afirmando su condición de Profesor Universitario.

Este alumno excepcional era Manuel Ortega Mata, quien había descorrido la incierta amanecida de su vida el 29 de enero de 1923, mecido por el gracejo y la sal de la bella ciudad de Málaga; en pleno corazón de la misma, la serenidad de su clima y la radiante alegría del sol mediterráneo, van moldeando, desde su cuna, la fina personalidad del recipiendario. Sus primeros años transcurren en un hogar tranquilo, con una esmerada educación y un elevado sentido moral y ético de la vida, que le confieren en su madurez unas cualidades humanas singulares.

El Dr. Ortega Mata estudia el Bachillerato en el Instituto de la propia ciudad de Málaga, perfilándose ya desde estos momentos como un joven inteligente y activo, que aspira a ocupar puestos destacados en su futuro quehacer profesional. Terminado su Bachillerato, se traslada a Madrid, donde cursa la Carrera de Farmacia, con las más brillantes calificaciones. Fue alumno interno de la Cátedra de Técnica Física, donde pudimos contar con su inestimable ayuda, en aquellos momentos especiales para nuestra vida docente. Creo que el Dr. Ortega percibió, apasionado, el eco, renovado cada día, de nuestras nobles aspiraciones y que entonces nació también en él, como por resonancia, el deseo incontenible, de llegar a alcanzar su condición de Profesor Universitario. Su licenciatura la termina el año 1945 con las máximas calificaciones, alcanzando el Premio Extraordinario y el Premio Nacional Fin de Carrera: Víctor de plata del SEU. En ese mismo año fue nombrado Becario de la Fundación Conde de Cartagena de la Facultad de Medicina.

Enseguida de terminada su carrera es nombrado Prof. Ayudante de Técnica Física y Físico-Química de la Facultad de Farmacia de Madrid, cargo que desempeña entre los años 1945-47, y en cuya época prepara asimismo su Tesis Doctoral, sobre la «Determinación polarográfica de cistina y cisteína en hidrolizados de proteínas», que, presentada en 1948, fue calificada de Sobresaliente *cum Laudem* y Premio Extraordinario. Inmediatamente gana, por oposición, la plaza de Profesor Adjunto de Físico-Química en la misma Facultad. Desde el año 1946 ya venía trabajando como Becario, con el mismo entusiasmo que en la docencia, en los Institutos Alonso Barba, Rocasolano y Ramón y Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, donde llega a alcanzar la condición de ayudante especial de la Sección de Físico-Química Biológica del citado Organismo, y donde presta sus servicios hasta el año 1968.

Con esta trayectoria y su acusada personalidad, que corre pareja con el rigor y pulcritud de sus trabajos experimentales, no es de extrañar que se le seleccione, entre los mejores universitarios, para que amplíe sus conocimientos y profundice sus experiencias investigadoras en el extranjero. Por eso el Consejo Superior de Investigaciones Científicas le pensiona durante el curso 1951-52 en el Instituto de Físico-Química de la Universidad de Upsala, donde trabaja a las órdenes del Profesor Claesson.

A su regreso de Suecia es requerido por el Instituto de Hematología y Hemoterapia para incorporarse a las tareas propias de este Centro, en el que llega a alcanzar el Cargo de Jefe de Servicio de Análisis Clínicos y control de productos hemoterápicos. En 1955 dicha entidad le envía a realizar estudios especiales en los Centros de Transfusión Sanguínea y de Desecación de Plasmas de París y Montpellier. En 1961 es nombrado Académico correspondiente de la Academia Internacional de Medicina legal y social de Viena.

La gran experiencia docente adquirida por el Prof. Ortega Mata, a lo largo de los años, llega a traspasar los propios límites de su Facultad, lo que hace que sea nombrado Prof. Adjunto de Física en la Facultad de Ciencias, donde imparte dichas enseñanzas durante los cursos 1959-63.

Al ser creada, en el año 1967, en la Facultad de Farmacia de Madrid, una plaza de Profesor Agregado de Técnicas Instrumentales, es nombrado interinamente para ocuparla, la cual gana en impecables oposiciones en el año 1968, y de la que hoy es titular. En aquella ocasión tuvimos la oportunidad de formar parte del Tribunal que juzgó dichas oposiciones, y una vez más pudimos conocer, directamente, la racional capacidad de expresión del Profesor Ortega, su admirable aptitud sistematizadora, así como su sugerente y suave forma de introducir a los alumnos en la materia objeto de sus explicaciones. Con ello culminaba una etapa continuada de dedicación a la enseñanza, seguida sin desmayos, y en la que fue formándose al lado del Dr. Portillo, maestro de todos nosotros, magnífico investigador y miembro destacado de esta Real Academia.

La hábil dialéctica del Prof. Ortega, sus magníficas condiciones para la convivencia fecunda y un espíritu abierto y comprensivo, le llevan a ocupar la Vicesecretaría de la Facultad de Farmacia de Madrid, desde el año 1968 al 71, siendo nombrado finalmente Secretario de la misma en 1972, cargo que ocupa, con eficacia y satisfacción de todos los claustrales, en el momento actual. Las especiales condiciones que hemos enumerado, hacen que la Facultad de Farmacia le nombre su representante en determinadas Comisiones de la Universidad, en las que se plantean siempre temas delicados, sabiendo que la presencia del Dr. Ortega serviría, en todo caso, de factor conciliador, sin detrimento de la defensa de los derechos de la Entidad que representaba. Así es Presidente de la Subcomisión de Con-

validación de Estudios de la Facultad de Farmacia desde 1971 y vocal de la Comisión de Convalidaciones, personal, admisión y régimen de alumnos y de la Comisión Económica de la Universidad Complutense. También ha sido vocal de numerosos Tribunales de pruebas de madurez y coordinador de Física en el Curso de Orientación Universitaria, formando parte, asimismo, de la Comisión que ha redactados los programas para la enseñanza de dicha disciplina en esta etapa de acceso a la Universidad.

Su vinculación con la temática hematológica, y los Análisis Clínicos en general, le llevan a ser nombrado vocal del Tribunal Central del Instituto Nacional de Previsión, que ha de juzgar la provisión de plazas de especialistas de Análisis Clínicos, así como las de estos mismos técnicos en los Ambulatorios de la Seguridad Social.

En la actualidad es Director del Gabinete Central de Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, y desde 1965 Profesor de Análisis Instrumental de la Escuela de Perfeccionamiento de Análisis Clínicos.

La seria vocación investigadora del Prof. Ortega le lleva a realizar numerosos trabajos, cuyo número de los publicados rebasa el medio centenar. Sus temas preferidos, siempre en relación con la problemática que interesaba a cada uno de los Centros donde prestó sus servicios, son los que se refieren a estudios polarográficos del índice de proteínas en sueros humanos patológicos, valoración de cistina en hidrolizados de proteínas, determinación de ácido ascórbico, ácido fólico, aspirina, etc. Investigación, con la misma técnica, sobre el comportamiento de los hematíes y de estractos de semillas, proteínas, aminoácidos, polipéptidos y cloramfenicol —tanto aislados como en presencia de polivinil pirrolidona y agentes tensioactivos—, así como de derivados del 2-nitrofurano y de la benzodiazepina. También realiza investigaciones sobre las propiedades de las soluciones de copolímeros de interés biológico; electroforesis sobre papel, en especial de proteínas y sueros humanos, con un destacado interés en los métodos de tinción; fotometría de llama aplicada a la determinación de sodio y potasio en sueros, leches y alimentos vegetales; diversos estudios bromatológicos y toxicológicos, así como sobre otras cuestiones de marcado interés farmacéutico entre las que destaca el estudio fluorimétrico de un grupo numeroso de antibióticos. Ultimamente lo que más ocupa su atención corresponde al tema que ha planteado en su

Discurso de Ingreso en esta Academia; es decir, el estudio de las fitohemaglutininas o lectinas y su interacción con células hemáticas humanas y otros diversos componentes de la sangre, en cuyo transfondo subyace la esperanza de contribuir a dilucidar, de alguna forma, ciertos problemas de la etiología del cáncer y su prevención.

Su labor de maestro se resume en la dirección de doce Tesis Doctorales y nueve Tesinas de Licenciatura, habiendo publicado además diversos artículos de divulgación relacionados con sus propios temas de estudio. También ha escrito un curso de Físico-Química en colaboración con el Dr. Portillo.

Ha asistido a numerosos Congresos, y pronunciado varias conferencias de su especialidad en diversas ciudades españolas. El equipo de investigación que ha logrado formar a su alrededor, y el conocimiento que se tiene de los trabajos que bajo su dirección se realizan, ha atraído a su Laboratorio a muy distintos profesionales para conocer las técnicas que en el mismo se desarrollan, y utilizar sus conocimientos, tanto teóricos como experimentales, para la resolución de muy diversos problemas. Destaquemos de entre estas asistencias la del Prof. Pérez Barré, de la Universidad de los Andes de Venezuela, y como por estas colaboraciones ha recibido el primer premio del Concurso del Colegio de Farmacéuticos de Málaga.

La vinculación del Prof. Ortega Mata a la Real Academia de Farmacia ha sido tan continuada y generosa, que en el año 1950 se le nombra Académico correspondiente. En 1962 gana el Premio Nacional de la misma; en 1957 el «Jerónimo Salinas»; y en 1971 el «José Marín». La mayoría de sus trabajos de investigación están publicados en los Anales de esta Real Academia. Bien puede decirse, por tanto, que su acceso, a la categoría de Académico de número, la ha alcanzado, además, de por sus méritos docentes, investigadores o universitarios, por su amor entrañable a esta Corporación, con la que ha colaborado asiduamente desde todos los puntos de vista y en todas las realizaciones que le fueron encomendadas o que él consideraba de interés para el mejor desarrollo de la vida corporativa.

A partir del año 1968, en que me incorporé al Departamento de Físico-Química y Técnicas Instrumentales de la Facultad de Farmacia de Madrid, al que pertenece el Prof. Ortega, nuestra colaboración ha sido la de repartirnos con generosidad las tareas docentes, resolver

en la mejor armonía el difícil problema de la masificación escolar y fomentar a todo nivel los contactos entre nuestros colaboradores, para que el entendimiento y la inteligente comprensión estuviera siempre por encima de los pequeños problemas que puede acarrear el trabajo en común. El tema de las fitoemaglutininas y su interacción con los componentes de la membrana celular, uno de cuyos capítulos abordo con una de mis hijas dirigiendo su Tesis Doctoral, nos ha llevado a un terreno de investigación cuyas analogías experimentales y de concepto son evidentes, ya que nosotros estudiamos desde hace tiempo un problema similar, cual es el de la interacción de aquellos antibióticos, que, como los poliénicos, actúan también a nivel de membrana. En estos momentos tenemos planteado un programa de investigación común, que esperamos ha de contribuir a estrechar aún más entre nosotros los inconmovibles lazos de amistad y comprensión que surgieron hace ya largos años, en aquel luminoso día en que los aires aún incontaminados del Madrid velazqueño, fueron testigos del encuentro de dos ilusiones que tendían a un mismo objetivo: la del joven alumno Manolo Ortega, que con la sonrisa en la flor de sus labios, veía abrirse las puertas de la Universidad con la luminosidad ardiente de un horizonte, que podría conducirle a los más elevados niveles de su vocación docente y la de un joven Profesor, que esperaba, con impaciencia, poder superar los últimos condicionamientos para alcanzar la tan ansiada condición de Catedrático de Universidad. Ello me devolvió a mi tierra natal, pero siempre con la nostalgia del equipo y tradición que tenía que abandonar. Llevaba también conmigo la esperanza de volver a incorporarme algún día a todo aquello que entonces se me perdía en la material lejanía. Así ocurrió, en efecto. El Prof. Ortega Mata tenía ya entonces un prestigio bien ganado y en aquellos primeros momentos, y otros posteriores, sus ayudas y consejos fueron para mí de un valor inestimable, que nunca he sabido cómo poder concretar en una adecuada expresión de agradecimiento. Creo que este instante, con su solemnidad, podría dar el brillo preciso a la sinceridad de la gratitud.

«El hombre es, en muchos casos tímido. Se avergüenza ante una brizna de hierba o la rosa que florece. Sin embargo, para esas rosas que nacen cada día no hay referencia a unas rosas anteriores o mejores. Son perfectas en cada momento de su existencia. Antes de

brotar una yema en la planta, su vida entera actúa. En la flor abierta no hay nada más; en la raíz nada menos».

* * *

La trayectoria personal del Dr. Ortega Mata nos muestra una vida dedicada por entero a la Universidad y a la Investigación, en la que todas sus horas y pensamientos están destinados a potenciar su acción, en el concepto ortegiano de transmitir el saber, formar dignos profesionales y crear Ciencia básica sustentadora de un auténtico magisterio.

Por eso, el análisis esquematizado de su devenir vital nos permite establecer algunas de las virtudes esenciales que deben de acompañar al Profesor Universitario, para ser considerado como tal. Releyendo con este motivo a Gastón Berger, y relacionándolo con ciertas observaciones de Emerson y Unamuno, podemos expresar nuestro sentir en esta cuestión de la forma siguiente:

La primera actitud interior, que, como arma más preciosa para la lucha que debe de afrontar, tiene que poseer todo profesor, es la calma o en frase unamunía, «aprender a pensar tranquilo». Cuanto más aprisa vayan las cosas, cuanto mayor sea la tendencia de las gentes a querer cambiarlo todo, en último sentido a enloquecer, más necesario se hace el permanecer en calma. No sólo es cuestión de elegancia, es cuestión de vida o muerte. Para los que sienten una indomable agitación interior, nada es nuevo bajo el sol, y esto hace estúpida la monotonía de la vida. Para los que viven en la quietud, cada mañana trae una frescura nueva.

Por eso el científico necesita estar penetrado de una gran humildad; de ese «saber estar» que es convivir. Saber renunciar a las falsas llamadas de las sirenas que distraen el intelecto. Ser perseverantes para alcanzar los objetivos propuestos, sin alteraciones ni malhumores, que desequilibran la conciencia. Siempre los benditos inmortales, como dice Zoroastro, están prestos para el mortal perseverante.

Todo ello supone estar en posesión de un sentido riguroso del deber; centrando la atención en la problemática de cada día, como una parte individualizada del discurrir continuado de una entrega permanente al estudio y al trabajo. Esta serenidad en la acción, que

supone hacer en cada momento todo lo que sea necesario, como si fuéramos a morir mañana, pero con la pulcritud y minuciosidad de un vivir eterno, se alcanza si se está bien arropado en un conocimiento cabal de las humanidades clásicas y del pensar filosófico, sin que falte una cierta dosis de ironía, dirigida hacia nosotros mismos más que a los demás. En fase de Lucrecio, es preciso poder contemplar el mundo con alma serena, donde la rectitud brote como agua y la justicia como río inagotable.

La segunda condición, que es preciso fomentar día a día en el Profesor Universitario, es la imaginación como fuerza creadora y como propia virtud. En una situación estable la razón es la facultad principal: es preciso deducir, prever, precisar. En un mundo móvil, e incesantemente renovado, es preciso inventar sin descanso y, antes que nada, es preciso inventar la propia vida. Esto no es nada fácil. Pero es preciso pensar que nuestra energía sale de nuestra debilidad. Un hombre cabal está siempre dispuesto a empequeñecerse. Cuando se ve empujado, atormentado, deprimido, tiene una posibilidad de aprender algo: hecha mano de su ingenio, de su valor; adquiere nueva experiencia: se cura de su locura de orgullo: su interés, más que el de sus atacantes, es hallar su punto débil. La herida cicatriza y la piel muerta se le desprende, y cuando los enemigos festejan su victoria, él continúa su camino imperturbable. La censura es más sana que la lisonja. En general, todo mal al que no sucumbimos, nos beneficia. Así ganamos la fuerza de la tentación que resistimos, excitando nuestra imaginación creadora. Así puede llegar silencioso el éxito, que para las ideas espera su sazón, tan sordo a las invocaciones del impaciente como a las execraciones del despechado.

En tercer lugar, todo profesor que desea alcanzar el título de maestro, debe fomentar entre sus colaboradores el espíritu de equipo en el que no haya adulación, y en el que, como expresa Milton, el consejo más sencillo es la mejor alabanza. En el mundo de hoy, las más brillantes aptitudes quedan fosilizadas si no se es capaz de integrarlas en una labor de conjunto. Se necesita inventar aquellas estructuras que puedan realizar un equilibrio entre la libertad, sin la cual la investigación no puede vivir y la coordinación, sin la cual cualquier esfuerzo pierde toda su fuerza. Pero ese equilibrio debe de establecerse entre la libertad por sumisión y no por rebeldía, intimando la ley colectiva externa y no volviéndose a sí mismo para pro-

clamar la propia. Llegar a una radical convicción de que lo que más cuenta es el haber hecho juntos una cosa en la que se creía y al hacer los gestos de la colaboración, que no son los hábitos adquiridos, descubrir uno de los valores más firmes de las sociedades humanas, sea cual sea su forma; es decir, la amistad.

Es necesario referirse, por último, al sentido de lo humano, que debe caracterizar a todo buen profesor. En todo caso es un valor incuestionable, pero mucho más en un mundo fascinado por la técnica, en el que los más grandes problemas son los que se plantea el hombre mismo. Hay que recobrar por tanto el sentido del humanismo, de acuerdo con la antigua acepción griega: la de ser tolerantes con las flaquezas humanas. Afirmando a su vez con ello nuestro propio ser, ya que ser algo no es resignarse a serlo tan sólo. Casi siempre perseguimos algún proyecto fugitivo o somos perseguidos por algún temor o mandato, pero si de pronto alcanzamos a comprender el sentido humano de los seres que nos rodean, nuestra agitación y nuestra prisa parecen necias. Nos conviene, por tanto, una posesión de nosotros mismos y la facultad de enchir el momento con los recursos del corazón. Si sabemos formar hombres libres, comprensivos, que intuyen lo que son y cómo estar entre los demás, y cuál debe ser su humilde y perseverante actitud en el aprendizaje de la Ciencia, se podría practicar esa enseñanza con la que sueñan todos los profesores, que no estaría constituida por el tedio, el agobio y la repetición, sino por la novedad, la invención y por esa cosa menos futil que el placer, menos incierta que la felicidad, que es la alegría.

* * *

En el erudito y riguroso discurso que hemos tenido la satisfacción de escuchar, el recipiendario expone el concepto actual de las fitohemaglutininas y su actuación a nivel molecular, con las consecuencias e implicaciones que ello comporta, tanto en el campo de la taxonomía botánica como en la interacción con hematíes, linfocitos, plaquetas, células tumorales, bacterias, virus y diversos tipos de macromoléculas, así como la importancia que todo ello representa en la diagnosis clínica así como en sus aplicaciones terapéuticas y profilácticas. Es este un tema poco conocido en nuestro país, y sobre todo, en el que los trabajos de investigación que sobre el mismo se

han realizado son muy escasos y fragmentarios. En la mayoría de los casos se refieren, tan solo, a una mera aplicación de estos compuestos con fines prácticos de interpretación clínica. Puede decirse, por tanto, sin faltar a la verdad, que el Prof. Ortega Mata y su equipo de trabajo son casi los únicos, o por lo menos los más cualificados, que en España se han ocupado de este importante problema con un sentido de interpretación básica fundamental.

La panorámica que aquí se nos ha presentado no tiene el carácter de una síntesis, obtenida a partir del entramado, más o menos bien urdido, de diversas aportaciones relacionadas con esta cuestión, sino que se trata de una exposición de reconocida continuidad que, a través de un planteamiento genérico, que no se pierde en ningún momento a lo largo del discurso, nos introduce en la importancia y profundidad del tema. Dentro de esa continuidad, en la que están insertos múltiples problemas, podemos entresacar cuatro cuestiones fundamentales que vamos a comentar brevemente:

En primer lugar, es de destacar como el considerable esfuerzo de estudios sucesivos, planteados con un sentido racional y en los que se han aplicado las técnicas de trabajo experimental más diversas y depuradas, ha permitido llegar a conocer, con bastante precisión, la estructura y localización de las fitohemaglutininas o lectinas —compuestos producidos por las plantas en respuesta a la acción agresiva de las bacterias o agentes de protección frente a los ataques bacterianos—, así como su modo de actuación. Tenemos aquí una muestra más de la acción previsora de la Naturaleza, que dota a cada uno de sus seres de los sistemas precisos para fabricar sus propios agentes terapéuticos o de defensa y, asimismo, nos hace pensar si ciertas propiedades curativas de algunas plantas —semillas, hojas, raíces, etc.— no podrán ser debidas a las fitohemaglutininas que están localizadas en tantas y tantas de las especies empleadas por los pueblos indígenas e incluso por los curanderos, con cierta eficacia, en el tratamiento de tumores malignos, afecciones sanguíneas, reumatismos, etc. Es importante poner de manifiesto, como se ha podido deducir, que estos compuestos ejercen, también, funciones de transporte y almacenamiento de azúcares o sirven de enlace de enzimas glicoprotéicos a diversos tipos de bacterias. Asimismo pueden actuar como agentes de control de la disociación celular o de autoreconocimiento entre células de plantas que pertenecen a

sistemas multienzimáticos. Algunas fitohemaglutininas, y en especial la concavalina, se localizan en los espacios citoplasmáticos, mientras que las llamadas β-lectinas se disponen en la membrana celular. Extraídas y purificadas, lo que hoy se realiza hasta extremos casi inconcebibles de eficacia y rendimiento, se muestran como glicoproteínas poliméricas, cuya disposición estructural comprende por lo general cuatro subunidades, que se acoplan en una disposición pseudo-tetrahédrica y dotadas de una acusada actividad aglutinante, frente a sistemas macromoleculares diversos, dotados de receptores apropiados. Esta acción se realiza debido a su carácter glico-protéico con grupos — SH, Mn^{2+} y Ca^{2+}, lo que les permite unirse a los grupos de la porción oligosacárida de la fracción glico-protéica o silo-protéica de la membrana, sirviendo de puente de enlace entre dos o más sistemas celulares.

Destaquemos la aportación original del Prof. Ortega y sus colaboradores al establecer la composición de las fitohemaglutininas del *Solanum tuberosum* y del *Myrtus comunis*, de entre las 197 especies positivas de las 375 estudiadas por ellos, y con las que viene trabajando desde hace bastantes años. En la primera han identificado la presencia de arabinosa, galactosa y glucosamina y en la fracción protéica de los aminoácidos, hidroxiprolina, cistina y ornitina, compuesto este muy poco común en las especies vegetales.

La acción de las fitohemaglutininas produce, en general, importantes cambios conformacionales, tanto en su propia estructura como en la de la membrana, lo que puede ponerse de manifiesto, en muchos casos, por medidas espectrofluorimétricas, indicadoras de las alteraciones que los citados enlaces producen en los grupos fluoróforos del sistema con respecto a su entorno. Debido a esta condición, las fitohemaglutininas son un grupo de sustancias muy útiles para estudiar la estructura de la membrana y sus modificaciones.

Al referirnos al modo de actuación de estos compuestos a nivel de membrana, surge inmediatamente el problema de la estructura de la misma. Esta es la segunda idea clave del discurso que comentamos. No es posible contemplar con el mínimo rigor los procesos de aglutinación de estos compuestos frente a eritrocitos, linfocitos, bacterias, virus, etc., si no se considera que aquella no es un fin en sí misma, sino un compromiso dinámico entre los imperativos de la

supervivencia celular y las condiciones del entorno que la rodea, con su relación funcional fenomenológica correspondiente.

Vamos a hacer unas breves consideraciones sobre este punto que consideramos crucial en el tema que nos ocupa. Aunque muchos prestigiosos autores siguen manejando en sus trabajos el modelo trilaminar de Danielli y Dawson o el generalizado por Robertson con la denominación de «unidad de membrana», es necesario afirmar, con toda claridad, que sólo el «modelo de mosaico fluido», postulado por Singer a partir de datos experimentales y consideraciones termodinámicas, es capaz de explicar acciones tales como las que se contemplan en este discurso.

Este modelo supone que las proteínas que están integradas en la membrana son agregados globulares, cualitativamente heterogéneos, ordenados en una estructura antifílica, con los grupos iónicos y polares proyectándose hacia la fase acuosa y los grupos no polares sumergidos en el interior hidrofóbico de la misma. Los agregados globulares protéicos o glico-protéicos están situados, como icebergs, sobre una matriz lipídica organizada en forma de bicapa, discontinua y fluida que, en estado fisiológico, es, por lo general, del tipo líquido cristalino. Una pequeña fracción de estos lipidos puede interaccionar, de forma específica, con algunas proteínas para formar ciertos complejos lipo-protéicos. En todo el conjunto existe un control termodinámico, por el cual la transformación de la estructura está condicionada por la secuencia de los aminoácidos, las uniones covalentes de las proteínas y sus interacciones con el entorno, de tal forma que la energía libre del sistema sea la mínima. En algunos casos, las proteínas integrales, con tamaño y estructura apropiada, pueden atravesar la membrana, es decir, que es posible que existan regiones de proteína en contacto con el disolvente acuoso en ambos lados de aquella.

La distribución de tales agregados sobre la superficie total de la misma, en un espacio de largo alcance, debe de esperarse que esté dispuesta al azar, como norma general: cuando se presentan distribuciones con una cierta ordenación deben de existir algunos mecanismos responsables de este estado.

Las perturbaciones que afectan a una membrana de esta estructura, tales como las que pueden ocurrir por la unión a la misma de

las fitohemaglutininas, alteran la disposición estructural de algunos de sus componentes o agregados; entonces se presenta una redistribución de los mismos por difusión traslacional a través de la solución viscosa propia del sistema, para volver a situarse en condiciones termodinámicas estables, en unos intervalos de tiempo muy pequeños, como hoy se sabe que ocurre en la acción de los anticuerpos sobre los leucocitos.

Visualizando, por microscopía electrónica, la distribución de los oligosacáridos en la membrana, se observa que, en la mayoría de los casos, se ataca precisamente la cara externa del eritrocito y no la superficie interna citoplasmática. Esto parece indicar que la transición rotacional desde la parte de fuera al interior de las membranas es prácticamente despreciable, ya que se necesita una cantidad de energía libre de activación muy grande, para hacer rotar las regiones polares o iónicas de las mismas a través de un espacio interior hidrofóbico. En resumen, la difusión traslacional, en dos dimensiones, de las proteínas, ocurre libremente, mientras que la difusión rotacional está restringida a los ejes perpendiculares al plano de la membrana y cuando se produce dicho giro es a una velocidad tan pequeña, que exige bastante tiempo para ponerse de manifiesto.

En algunas condiciones el proceso perturbador, que se inicia en un sitio, se transmite a otro situado a bastante distancia, debido a un efecto cooperativo. Este puede ser de tipo trans, como el cambio alostérico que se refiere a la transmisión de un efecto determinado de una cara a la otra. Por el contrario, el efecto llamado cis se produce en la superficie de la membrana entera, o en grandes áreas de la misma, como procesos que ocurren en un solo punto o en unos pocos bien diferenciados y que se transmiten y amplifican al modificarse las interacciones estructurales, lo que puede ser perfectamente aplicable al problema de la acción de las fitohemaglutininas, con la formación de los casquetes citados en el discurso.

En este caso había que tener también en cuenta el modelo alostérico de Monod-Wyman, adoptado por Changeux y cols. para explicar los procesos cooperativos de las proteínas de las membranas. Las subunidades individuales pueden existir en uno o en varios estados de conformación, de los cuales, el llamado normal, tiene mucha mayor facilidad de enlace para un ligando específico que el otro.

Si la proteína está dispersa monomolecularmente en la membrana, la nueva conformación promovida por la únión con el ligando origina una agregación termodinámicamente más estable. Entonces se produce una difusión de las proteínas que no tienen carácter ligante hacia el complejo formado, produciéndose, en consecuencia, un cambio simultáneo en la conformación de todos los agregados protéicos. Este mecanismo, de tipo cis, ocurre a una velocidad que se corresponde con la difusión de las moléculas protéicas en el «modelo de mosaico fluido». Esto originaría una agregación de subunidades que están normalmente dispersadas en la membrana o variaciones en el estado fluido de la misma, factores que afectan de una manera muy destacada a la cinética de las transiciones fluorescentes, como ocurre en la acción de las fitohemaglutininas.

No hay que olvidar, sin embargo, el papel que en los procesos de aglutinación juega la carga neta superficial de la membrana, que depende de las relaciones de polaridad en los componentes de su estructura. Por eso todas las modificaciones que se pueden producir en la misma, disminuyendo su carga neta superficial, como el tratamiento con neuroamidasa, tripsina o protamina, influyen profundamente en el proceso de aglutinabilidad.

El poder estudiar, aplicando técnicas muy sensibles y depuradas, la acción de las fitohemaglutininas sobre liposomas a los que se agreguen glico o sialoproteínas aisladas de los hematíes, o bien otros compuestos o factores que alteren la estructura de la membrana, tanto en su ordenación, como en su carga neta superficial, o en la distribución en la misma de las sustancias receptoras, nos parece de un gran porvenir y al que es preciso dedicar una máxima atención.

Con este comentario queda bien claro que en la funcionalidad de la membrana adquiere singular relevancia el concepto de forma y la idea hegeliana de que la Naturaleza es un compuesto de formas engarzadas unas en otras; formas de formas y formas de estas formas, en proceso inacabable, del que brotan las cualidades con el rigor cuantitativo de la Termodinámica.

Cuando a cultivos de linfocitos se añaden fitohemaglutininas se produce una transformación blástica, fase previa de un incremento de la actividad mitótica, que lleva a la división celular, con procesos metabólicos, entre los que destaca la síntesis de RNA y DNA, e

incluso a una lisis celular. El estímulo blástico permite establecer las relaciones entre ciertas anormalidades en los cromosomas y determinadas enfermedades, sobre todo deficiencias en el sistema inmunitario. La acción terapéutica de medicamentos específicos, en algunas enfermedades que presentan una prueba blástica baja, muestra, en muchos casos, su normalización, que vuelve a reducirse al suprimir el tratamiento medicamentoso.

Esto se produce por cambios en los mecanismos de transporte y permeabilidad de la membrana, que pueden ser debidos al recambio acelerado de sus restos de ácidos grasos, a la variación en el metabolismo de los fosfolípidos o a su variable disposición estructural, reguladora, en la mayoría de los casos, de los mecanismos antes mencionados.

Durante mucho tiempo se ha considerado que el único objetivo de la presencia de los lípidos en la membrana era formar una barrera hidrofóbica con el exterior. Sin embargo, los compuestos lipídicos que se han aislado de diversos tipos de membrana demuestran, que, en su conjunto, existe una compleja distribución de grupos polares y cadenas hidrocarbonadas que facilitan la posibilidad de que se formen estructuras muy diversas en sus interacciones, y que los sistemas lípido-agua estén asociados con algunas de las propiedades funcionales de aquéllas; no cabe despreciar su importancia en el mecanismo de interacción de las fitohemaglutininas con la membrana, o por lo menos la influencia de su ordenación o movilidad, en lo que respecta a su enlace con las glicoproteínas. Este es el tercer punto que deseamos comentar del discurso expuesto.

Los fosfolípidos presentan, a bajas temperaturas, sus cadenas alifáticas en una configuración transplanar, con ligeras oscilaciones torsionales. Cuando en dichos compuestos se va elevando la temperatura, se aumenta el movimiento molecular, llegando a alcanzarse, en el punto de transición, un cambio endotérmico muy acusado, en el que las cadenas hidrocarbonadas «funden» y se produce una rotura de la disposición planar con una compleja flexibilidad y amplitud de oscilaciones y rotaciones, llegando incluso a originarse difusiones laterales de tipo cooperativo.

Por debajo de la temperatura de transición, el agua no puede penetrar en la red formada por los grupos polares, pero, a partir de la misma, los lípidos se hinchan. Cuando el agua ha penetrado

en su red estructural y éstos se enfrían después, por debajo del punto de Kraft, aquella no se expulsa del conjunto, quedando entonces las cadenas hidrocarbonadas con una ordenación casi total. Se alteran así las propiedades de transporte y difusión a través de la membrana. Esta disposición estructural corresponde al estado microscópico de un gel en fase exagonal. El ordenamiento laminar, que se presenta por encima del punto de Kraft, es análogo, pero con las cadenas hidrocarbonadas dotadas de una gran movilidad, formando una fase de tipo líquido cristalino.

Cuando existen grupos ionizados, éstos pueden interaccionar por su polaridad. La relación de la carga neta superficial, por grupo polar, puede dar lugar a la estructuración de los lípidos en fases laminares, exagonales, cúbicas, etc., pero con puntos de transición diferentes. La temperatura de transición entre fases depende de muchos factores, entre los que hay que contar como elemento principal la propia composición lipídica de la membrana.

Todo lo que hemos venido indicando hasta ahora corresponde a membranas que no contienen colesterol; si éste existe en la misma, se considera que se produce una clara condensación del sistema, con un evidente aumento de su viscosidad microscópica, produciéndose un empaquetamiento casi rígido de las cadenas hidrocarbonadas, con un elevado grado de ordenación, impidiendo que puedan llegar a rotar a lo largo de su eje vertical. Esta es la cuarta idea que vamos a analizar brevemente en relación con el discurso del Prof. Ortega y con sus posibles consecuencias en la etiología del cáncer.

De todos los resultados obtenidos hasta la fecha se deduce que, a una determinada temperatura, la presencia de colesterol produce en las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de diferentes fosfolípidos, un estado de «fluido intermedio». En aquellos lípidos que se encuentran, normalmente, por encima de su temperatura límite de transición, se reduce el movimiento de sus cadenas al añadirles colesterol, mientras que los lípidos que, en condiciones biológicas, se encuentran al estado de gel, adquieren una mayor fluidez.

El aumento de las dimensiones de la bicapa lipídica y la variación de su fluidez, suponen un cambio en la permeabilidad de la misma. Así las propiedades permeables pasivas de una membrana pueden estar determinadas por su contenido en lípidos y esteroides, mientras que algunas de las permeabilidades selectivas más deli-

cadas, son, sin ninguna duda, originadas por proteínas específicas o enzimas. No obstante, estos sistemas específicos pueden ser controlados a su vez, secundariamente, por el efecto de condensación del esteroide a través de las interacciones lípido-proteína.

Como hemos demostrado en nuestros estudios sobre la interacción de antibióticos con liposomas de fosfolípidos que contienen colesterol, la acción de éstos, sobre la estructura del modelo de membrana, depende de la relación colesterol-fosfolípido. Las escuelas de van Deenen y Kruijff han puesto de manifiesto, asimismo, el valor que representa dicha relación en los procesos conformacionales de la membrana y su influencia en la permeabilidad de la misma. Incluso Caspar y Kirschner indican que como el colesterol no se encuentra en relación equimolecular con los lípidos totales, la asociación que entre ellos se puede formar está distribuida sólo en determinadas áreas superficiales, dando lugar a una permeabilidad diferente, en determinadas partes de la membrana.

Es evidente que este problema es fundamental en relación con la influencia del colesterol en los linfomas. Se ha observado que en tumores malignos inducidos en ratas existe una menor cantidad de colesterol en la membrana celular correspondiente, lo que daría lugar a una disminución de su microviscosidad superficial. La incorporación de colesterol a estas células, hasta alcanzar valores normales, reduce el efecto cancerígeno. Esto mismo se observa en linfocitos procedentes de pacientes con leucemia linfoide crónica.

Como indica el Prof. Ortega, la viscosidad de las membranas biológicas, que depende de la relación colesterol-fosfolípido, es el parámetro físico más importante para poner en marcha muchos de los procesos funcionales de las mismas, entre los que podemos destacar, en esta ocasión, su respuesta inmunológica.

La estimulación con fitohemaglutininas disminuye también esta microviscosidad, debido a que al formarse las células blásticas disminuye la relación colesterol-fosfolípido, puesto que aumenta la biosíntesis de estos compuestos, así como la superficie total de la membrana, sin que por otra parte varíe la cantidad total de colesterol. Al aumentar la fluidez de la membrana, por estas condiciones, es normal que se facilite la formación de los llamados casquetes, o sea los agregados proteínicos que facilitan la aglutinación celular.

Estamos de acuerdo con el Prof. Ortega, como resultado de nuestras investigaciones, que el colesterol situado en el lugar adecuado de la membrana y a la concentración debida, resulta vital para la correcta actividad celular y el control de sus mecanismos de defensa. Por eso creemos del máximo interés conocer las condiciones de la interacción de las fitohemaglutininas con fosfolípidos y colesterol, aislados o en conjunto, como parte fundamental de su actuación sobre la membrana celular. En todo caso, y en cualquier circunstancia, es preciso analizar los procesos cinéticos que en cada una de estas uniones se pueden presentar, como nosotros hemos visto ocurre en las interacciones con antibióticos.

Considerando que una aglutinina es capaz de distinguir una célula tumoral de otra normal, no es extraño que en estas experiencias se basen investigaciones actuales que intentan obtener alguna información sobre el mecanismo y transformación de una célula normal en cancerosa. En este campo, el doctor Ortega describe sus aportaciones originales sobre la acción de las fitohemaglutininas, extraídas de las semillas del *Myrthus comunis*, en el crecimiento de tumores malignos del tipo Yoshida, inducidos en ratas por el agente cancerígeno o-amino azotolueno, con unos porcentajes de disminución tumoral del 30 al 60 por 100.

Si como se indica en la disertación que comentamos, la aglutinabilidad de las células por las fitohemaglutininas pone de manifiesto la transformación de una célula normal en cancerosa por variación de su microviscosidad y de la movilidad de los receptores, la eficacia de los agentes anticancerígenos clínicamente útiles, produciendo modificaciones en la membrana de las células tumorales, podría detectarse por ensayos de aglutinación.

Otras muchas cuestiones de este importante tema cabría analizar como resultado de lo expuesto por el Prof. Ortega, así como las interacciones de las fitohemaglutininas en el campo microbiológico, parasitológico, de los virus y otros sistemas celulares. Aunque la limitación de espacio y tiempo no nos lo permite, las ideas que hemos tratado de glosar y comentar son, en su generalidad, los principales determinantes de su mecanismo de acción, expuestos por el recipiendario con toda claridad.

* * *

Si el discurso del Prof. Ortega Mata plantea un problema de gran actualidad, en el que por muchos senderos, de base biológica o físico-química, se va en busca del entendimiento de procesos vitales y patológicos, que en su recta final tiende a mejorar la salud, y prevenir las enfermedades, diagnosticándolas precozmente, algunos podrían sentirse recelosos por creerse, desde antiguo, poseedores de estas Ciencias que hoy reciben el calificativo de «moleculares» o bien el desdén de aquellos que sólo sienten interés por las cosas prácticas en la vida profesional, considerando, por envidia o ignorancia, que las teorías y los argumentos científicos son meras curiosidades, como dice Feijoo en sus cartas eruditas. Hay que pensar, sin embargo, que de esas curiosidades se obtiene el armazón científico que sustenta los adelantos prácticos que hacen una Nación grande y poderosa. Esta tesis, que ha sido siempre defendida por D. Santiago Ramón y Cajal y por Ortega y Gaset en su libro *La rebelión de las masas*, hizo exclamar a Gregorio Marañón estas frases tan llenas de sentido realista: «Todavía vienen a nuestros hospitales, médicos (nosotros podríamos aplicarlo a los farmacéuticos) que dicen: yo no quiero aprender teorías sino sólo la práctica, y se aprestan a apuntar recetas que oyen prescribir para éste o el otro síntoma de enfermedad. Pero esa teoría que desdeñan, es la madre de la receta salvadora, y la receta no es nada sin la teoría; la receta cambia, se supera: vivir con ella sólo es como vivir de limosna, es como si una vez lleno el cántaro de agua, se cegara el manantial de donde brotasen las aguas venideras.»

Una vez que hemos escuchado con la más expectante atención este magnífico discurso, en el que están perfectamente conectados los conocimientos teóricos más actuales, con una aportación original destacada y un sentido de aplicación práctico evidente, comprenderéis con cuánta justicia y acierto recibe hoy la Real Academia de Farmacia a tan distinguido compañero. Por eso me siento muy honrado por darle la bienvenida en nombre de la misma, y al felicitarle a él, felicitarnos a nosotros mismos por la valiosa aportación que su ingreso representa para esta ilustre Corporación.