

IDENTIFICACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS CON LAS LECTINAS DE *Olneya tesota* (IF2) Y *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) POR CITOMETRÍA DE FLUJO

IDENTIFICATION OF THE INTERACTIONS OF HUMAN MONOCYTES WITH *Olneya tesota* (IF2) AND *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) LECTINS USING FLOW CYTOMETRY

Guzmán-Partida AM¹, Félix-Favela F¹, Mata-Haro V¹, Lopez-Laredo AR^{1,2}, Urbano-Hernández G¹, Robles-Burgueño MR¹, Candia-Plata MC³ y Vázquez-Moreno L^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México. | ²Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Apartado Postal 24, Yautepec, Morelos, México. | ³Laboratorio de Bioquímica Clínica. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

En este estudio se purificaron tres isolectinas (IF1, IF2 e IF3) de la lectina de palo fierro (PF2) a partir de las semillas de *Olneya tesota*, usando cromatografía de afinidad, seguida de intercambio iónico. La isoforma más abundante de PF2 (IF2) y la lectina de frijol PHA-L se utilizaron para identificar el patrón de reconocimiento hacia células mononucleares de sangre periférica humana por citometría de flujo. Todos los tipos sanguíneos (ABO) presentaron un perfil de reconocimiento similar por las lectinas. En particular, las estructuras oligosacáridas de los monocitos circulantes fueron reconocidas por IF2 y PHA-L con mayor intensidad que el resto de las células. Los linfocitos B y T presentaron una menor interacción con IF2 que con PHA-L. Los receptores carbohidrato de IF2 pudieran ser usados como marcadores potenciales de monocitos en patologías asociadas con estas células.

Palabras clave: Lectina PF2; *Olneya tesota*; Lectina de frijol (PHA-L), *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

In this study, three isolectins (IF1, IF2 and IF3) of palo fierro lectin (PF2) were purified by affinity and ionic exchange chromatography from *Olneya tesota* seeds. The most abundant isoform of PF2 (IF2) and PHA-L (*Phaseolus vulgaris* lectin) were used to identify the recognition pattern toward mononuclear peripheral blood cells using flow cytometry. All blood types (ABO) presented a similar recognition profile for the lectins. Particularly, the oligosaccharide structures of monocytes were strongly recognized by both IF2 and PHA-L than those from other cells. Lymphocytes B and T presented less interaction with IF2 than with PHA-L. The carbohydrate receptors of IF2 could serve as potential markers for monocytes in pathologies associated to these cells.

Keywords: PF2 lectin; *Olneya tesota*, *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) lectin.

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que reconocen específica y reversiblemente a carbohidratos, dando

lugar a la aglutinación o precipitación de polisacáridos y glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980; Kocourek y Horejsi, 1981; Sharon y Lis, 1989). En el reino vegetal, las semillas de leguminosas se han destacado por ser una fuente rica de lectinas, llegando a constituir hasta el 10 % de la proteína total soluble (Van Damme *et al.*, 1997). Estas lectinas son un grupo de proteínas homólogas, cuya especificidad por carbohidratos varía ampliamente. En su mayoría son inhibidas por monosacáridos (Loris *et al.*, 1998; Moreno *et al.*, 2008), pero existe un número reducido de lectinas que únicamente son inhibidas por carbohidratos complejos, como las lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E y PHA-L) (Cummings y Kornfeld, 1982), *Phaseolus acutifolius* var. *escumite* (EsL) (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007), *Acacia constricta* (Guzmán-Partida *et al.*, 2004), *Griffonia simplicifolia* (GS IV) (Loris *et al.*, 1998) y *Olneya tesota* (PF2) (Vázquez-Moreno *et al.*, 2000). PHA-E y PHA-L reconocen oligosacáridos biantenarios bisectados (estructuras abundantes en eritrocitos) y oligosacáridos tri y tetrantenarios (abundantes en leucocitos), respectivamente. La lectina PF2 de *Olneya tesota* es específica para oligosacáridos triantenarios tetrasialilados (Urbano-Hernández, 2007).

Por otro lado, las células presentan en su superficie una mezcla compleja de receptores y ligandos, los cuales son mediadores de la adhesión celular y de la comunicación célula-célula. Frecuentemente ambos componentes están glicosilados y proveen de señales a las células (Sampson *et al.*, 2001).

La habilidad de las lectinas de leguminosas de reconocer carbohidratos de forma específica las hace excelentes herramientas para la investigación clínica, participando en la identificación y caracterización de los oligosacáridos de poblaciones celulares, así como también para la identificación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos presentes en algunos trastornos (Sampson *et al.*, 2001; Castillo-Villanueva *et al.*, 2007; Porras *et al.*, 2005). La lectina de *Arachis hypogaea* reconoce timocitos corticales inmaduros, mientras que la lectina de *Glycine max* fracciona esplenocitos T y B (Reisner *et al.*, 1976a; Reisner *et al.*, 1976b). La lectina de *Helix pomatia* ayuda en la identificación y aislamiento de células T (De Petris

*Autor para correspondencia: Luz Vázquez-Moreno
Correo electrónico: lvazquez@ciad.mx

Recibido: 10 de diciembre de 2012

Aceptado: 28 de enero de 2013

y Takacs, 1983). Por otra parte, la lectina de *Triticum vulgare* se usa en la purificación de linfocitos B (De Dios *et al.*, 1986), mientras que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* es específica para células T humanas y no reconoce linfocitos B (Ortiz *et al.*, 1982; Zenteno *et al.*, 1985; Lascrain *et al.*, 1997; Porras *et al.*, 2005). Asimismo, EsL reconoce linfocitos T humanos (Castillo-Villanueva, *et al.*, 2007).

Debido a las diferencias de afinidad de las lectinas por carbohidratos y a su uso en la identificación de poblaciones celulares, este trabajo se enfocó en la identificación de las células de sangre periférica humana que, son reconocidas por las lectinas PF2 (IF2) y PHA-L, usando citometría de flujo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Reactivos

Las muestras de sangre de todos los tipos (ABO) fueron proporcionadas amablemente por el Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (CETS) en Hermosillo Sonora, a partir de donadores saludables. Las semillas de *Olneya tesota* fueron recolectadas de árboles maduros localizados a las afueras de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. La agarosa activada con divinil sulfona (Mini-Leak) fue adquirida de Kem-En-Tec (Hellerup, Denmark). HiTrap SP HP y Ficol-Paque Plus, de GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Los estándares de peso molecular de amplio rango SDS-PAGE fueron de BioRad (Hercules, CA, USA). La leucoaglutinina (PHA-L) se obtuvo de Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA) y el Alexa Fluor 488, de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Los anticuerpos anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-APC, anti-CD14-APC-Cy7, específicos para humanos, fueron de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA). El anticuerpo CD20-PE se adquirió de BD-Biosciences (San José, CA, USA). La fetuina bovina y el resto de los reactivos fueron de Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA).

Extracción de las Proteínas de *Olneya tesota*

La extracción de las proteínas de las semillas de *Olneya tesota* y la purificación de la lectina PF2 mediante cromatografía de afinidad PF2 se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Vázquez-Moreno *et al.* (2000).

Purificación de la Isolectina IF2

La presencia de isoformas de PF2 fue evaluada por cromatografía de intercambio iónico, siguiendo el procedimiento reportado por Guzmán-Partida *et al.* (2004). La lectina purificada por afinidad fue aplicada a una columna Hi-Trap SP (5 mL), acoplada a un AKTA Purifier 100 System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y equilibrada con amortiguador de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,02 M, pH 6,0. Las isolectinas fueron eluidas usando un gradiente lineal de concentración de NaCl (0 – 0,34 M) en el amortiguador de equilibrio. Las fracciones correspondientes a cada isoforma (IF1, IF2, IF3) fueron detectadas a 280 nm y dializadas contra el amortiguador de fosfatos, para ser sometidas nuevamente a cromatografía de intercambio iónico bajo las mismas condiciones. Las fracción

IF2 obtenida se dializó contra agua milli-Q, se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su análisis y posterior uso.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La pureza de PF2 y sus isoformas se analizó por electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras de acuerdo a Laemmli (1970), usando un gel de gradiente lineal del 8-22 %. Se cargaron 4 µg de proteína en cada pozo y el gel fue teñido con azul de Coomassie. La masa molecular por subunidad de la lectina fue estimada por comparación con marcadores moleculares (BioRad).

Concentración de Proteína

La concentración de proteína se estimó de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1951), empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica

Se tomaron muestras sanguíneas por punción venosa de los tipos A, B, AB y O. La sangre fue recolectada en tubos al vacío con citrato de sodio, como anticoagulante. Cuatro mL de la sangre fueron cuidadosamente colocados en Ficol-Paque PLUS (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) y centrifugados de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células mononucleares (PBMC por sus siglas en inglés) fueron aisladas de la capa de la interfase leucocitaria, lavadas con amortiguador salino de fosfatos (PBS) y suspendidas en solución de lisis (NH_4Cl 0,15 M, KHCO_3 1 mM, EDTA 0,2 mM) por 5 minutos para remover los eritrocitos. El paquete celular fue lavado con PBS y las células fueron contadas en un hemocitómetro, para luego evaluar su viabilidad mediante la prueba de exclusión con azul de tripano.

Reconocimiento de Leucocitos Usando Citometría de Flujo

El patrón de reconocimiento de las PBMC hacia IF2 y PHA-L fue analizado mediante citometría de flujo usando anticuerpos e isoformas de las lectinas conjugadas con el fluorocromo Alexa Fluor 488. Los anticuerpos monoclonales anti-CD4-PE-Cy5, anti-CD8-APC, anti-CD14-APC-Cy7 y anti-CD20-PE, específicos para humanos, fueron usados para identificar a las células T cooperadoras CD4, células T citotóxicas CD8, monocitos y células B, respectivamente. Por su parte, IF2 y PHA-L fueron conjugadas con Alexa Fluor 488, siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Aproximadamente 250 000 células fueron suspendidas en PBS e incubadas, en oscuridad, con 10 µL de cada anticuerpo a 8 °C por 30 min. Las células fueron lavadas con PBS, centrifugadas a 204 x g por 10 min, resuspendidas nuevamente en PBS y analizadas en un citómetro de flujo FACScanto II (BD biosciences, San Jose, CA). Las fracciones

celulares correspondientes a monocitos y linfocitos fueron distinguidas por sus propiedades características de dispersión frontal (FSC) y ortogonal (SSC). Se adquirieron al menos 10 000 eventos en todos los experimentos. Se registraron los porcentajes de cada población y subpoblación celular, así como el valor lineal de la fluorescencia relativa (FR) de IF2 y PHA-L con el tipo celular. Las FR (transformadas a logaritmo de FR) del tipo sanguíneo, tipo celular e isolectinas se analizaron por ANOVA y las medias se compararon con una prueba de Tukey-Kramer usando el software NCSS 2007 (Kaysville, Utah, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La lectina PF2 fue obtenida por cromatografía de afinidad con una columna de agarosa-fetuina, tal como fue descrito por Vazquez-Moreno *et al.* (2000). Para investigar la ocurrencia de isolectinas (isoformas), la fracción de lectina PF2 se aplicó a la columna HiTrap SP de intercambio iónico. PF2 mostró estar constituida por una mezcla de isolectinas que fueron resueltas en tres fracciones denominadas IF1, IF2 e IF3, siendo eluidas con un gradiente lineal de NaCl. Cada fracción de lectina fue recromatografiada para lograr una mayor pureza (Figura 1). La homogeneidad aparente de la lectina PF2 y sus isoformas fue confirmada por electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y reductoras. Se observó en todas las fracciones una sola banda de 33 kDa (inserto en Figura 1). La presencia de isoformas en las lectinas de leguminosas ha sido bien documentada. Por ejemplo, las lectinas de *Phaseolus vulgaris*, *Acacia constricta*, *Phaseolus lunatus* y *Phaseolus acutifolius* tienen una mezcla de isoformas con distintas características moleculares y propiedades

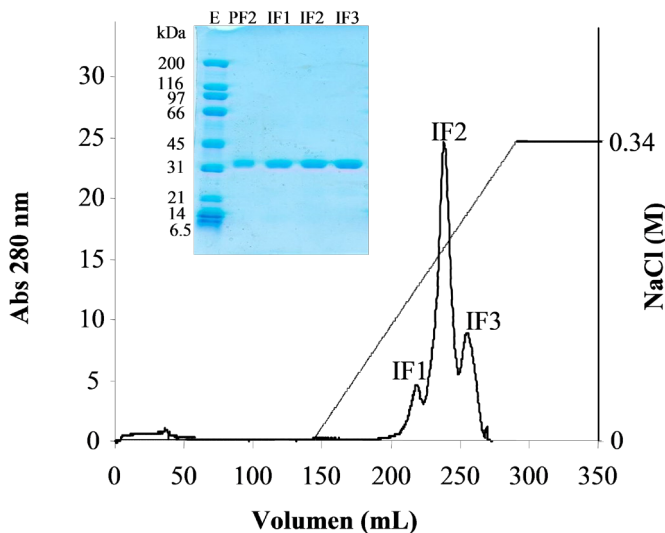


Figura 1. Purificación de la lectina PF2 y sus isoformas por cromatografía de intercambio catiónico en un columna HiTrapSP. Inserto: análisis electroforético SDS-PAGE de PF2 e isoformas. (E) Estándar de peso molecular.

Figure 1. Purification of PF2 lectin isoforms by cation-exchange-chromatography on HiTrapSP. Insert: SDS-PAGE analysis of PF2 lectin and isoforms. (E) Molecular weight standards.

biológicas (Leavitt *et al.*, 1977; Roberts *et al.*, 1982; Guzmán-Partida *et al.*, 2004; Castillo-Villanueva *et al.*, 2007).

Debido a la abundancia de IF2 y a que no presentaron diferencias en términos de reconocimiento de carbohidratos con las otras isolectinas, esta fracción proteica fue seleccionada para realizar el análisis de reconocimiento por leucocitos. La lectina de frijol PHA-L fue adquirida comercialmente.

Una vez eliminados los eritrocitos de las muestras de sangre periférica, la identificación de las células se realizó mediante la incubación con anticuerpos anti-CD y con las lectinas de estudio, ambos marcados con fluoresceína y su posterior análisis se realizó por citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales anti CD se unieron a las células que expresan el antígeno en particular (Figura 2). Los linfocitos T fueron reconocidos por anti-CD4 y anti-CD8, mientras que los linfocitos B con anti-CD20. El análisis estadístico de los resultados mostró que, tanto los linfocitos T como los B tie-

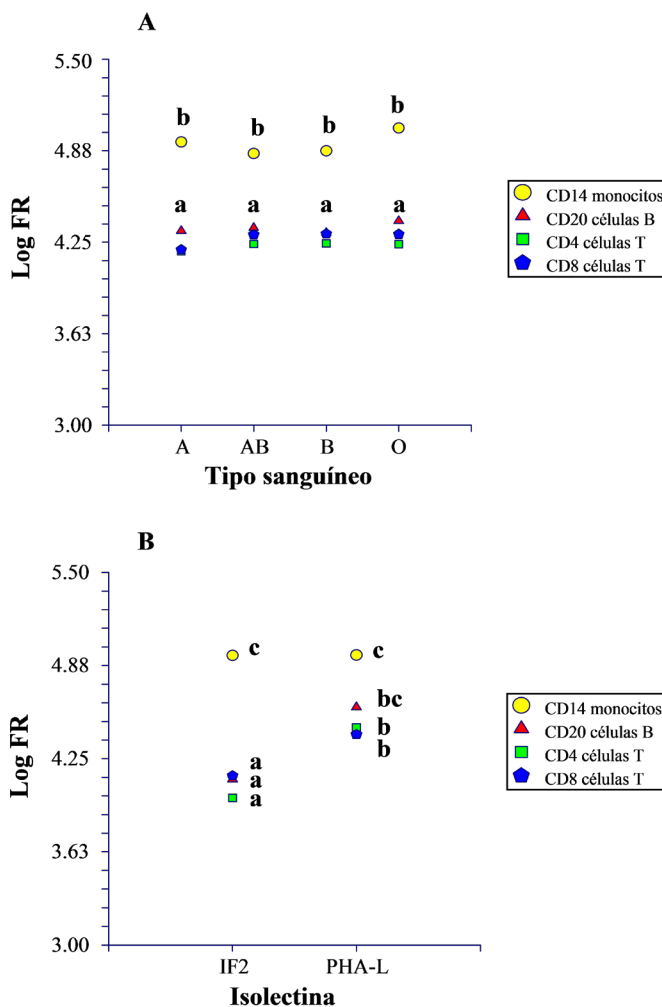


Figura 2. Patrón de reconocimiento de células mononucleares medido como logaritmo de la fluorescencia relativa usando citometría de flujo. (A) Reconocimiento por tipo sanguíneo. (B) Reconocimiento por tipo de isolectina.

Figure 2. Mononuclear cells binding pattern measured as logarithm relative fluorescence using flow cytometry. (A) Recognition by blood type. (B) Recognition by isolectin type.

nen una fluorescencia relativa (log de FR) significativamente menor a la presentada por los monocitos (identificados con anti-CD14). El patrón de reconocimiento por las distintas células fue similar en todos los tipos del sistema ABO (Figura 2A). Esto indica que los antígenos reconocidos por sus respectivos anticuerpos anti-CD se presentaron en cantidades similares en todas las células de los distintos tipos sanguíneos.

Bajo las mismas condiciones de análisis, cuando se usaron las lectinas IF2 y PHA-L ambas presentaron una afinidad similar para las células identificadas como monocitos (Figura 2B). No hubo diferencia significativa entre los valores de las lectinas por los monocitos. Por otro lado, con los linfocitos, PHA-L presentó una señal superior a la respuesta de IF2. Esta diferencia se puede atribuir a que IF2 reconoce únicamente a oligosacáridos triantenarios, mientras que PHA-L tiene afinidad a oligosacáridos tri y tetrantenarios, es decir que la respuesta de PHA-L representa la suma de dos clases de oligosacáridos. Además, esto apunta a que en las membranas de los monocitos se tienen más oligosacáridos afines a la IF2 (hasta nueve veces más) que en los linfocitos B o T; o bien, a que la disponibilidad de estos oligosacáridos sea mayor. La diferencia en el reconocimiento entre linfocitos y monocitos usando PHA-L fue menor por la razón antes señalada. Es importante indicar que los leucocitos de todos los diferentes tipos sanguíneos presentaron distribuciones similares a los discutidos (datos no mostrados).

Nuestros resultados respaldan lo señalado en otras investigaciones sobre la diversidad de las estructuras de los oligosacáridos presentes en las membranas y al hecho de que la glicosilación varía entre las células y por la etapa de madurez del organismo, presentando diversas proporciones en sus carbohidratos complejos (Motoyoshi *et al.*, 1990; Baum *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996; Mérant *et al.*, 2005; Hossler *et al.*, 2009). Las diferencias en la glicosilación de las células es atribuida a la expresión diferencial de glicosiltransferasas y a la disponibilidad de sustratos para las mismas (Baum *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 1993; Mérant *et al.*, 2005; Hossler *et al.*, 2009). Además, la expresión de carbohidratos varía con la etapa de desarrollo, la diferenciación y el tipo de células, tal y como se encontró en un estudio histoquímico usando las lectinas PF2 y PHA-E donde se observó que PF2 reconocía a las células B de tejidos linfoides provenientes de biopsias de niños de tres meses de edad. En cambio, PHA-E tiñó restringidamente a las regiones ricas en células T del bazo y ganglio (Urbano-Hernández, 2007).

CONCLUSIONES

Las membranas de los leucocitos circulantes presentan una diversidad de estructuras de oligosacáridos, las cuales pueden ser identificadas por medio de lectinas. En el presente trabajo se estableció el reconocimiento celular a partir de sangre periférica de adultos utilizando la isoforma más abundante de PF2 y PHA-L. Las lectinas IF2 y PHA-L reconocieron a los oligosacáridos triantenarios presentes de manera abundante en los monocitos, poniendo de mani-

fiesto su reducida presencia en los linfocitos B y T en todo el sistema ABO. Estas variaciones en la expresión de los carbohidratos hacen de las lectinas una herramienta importante para la identificación y separación de células sanguíneas. En particular, IF2 podría tener un gran potencial de aplicación como marcador en investigaciones relacionadas con cambios en la expresión de carbohidratos y en patologías asociadas con monocitos circulantes.

BIBLIOGRAFIA

- Baum, L.G., Derbin, K., Perillo, N.L., Wu, T., Pang, M. y Uittenbogart, C. 1996. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J. Biol. Chem.* 271:10793-10799.
- Castillo-Villanueva, A., Caballero-Ortega, H., Abdullaev-Jafarova, F., Garfias, Y., Jimenez-Martinez, M.C., Bouquelet, S., Martinez, G., Mendoza-Hernandez, G. y Zenteno, E. 2007. Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. escumite: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *J. Agric Food Chem.* 55:5781-5787.
- Cummings, R.D. y Kornfeld, S. 1982. Fractionation of asparagine-linked oligosaccharides by serial lectin-Agarose affinity chromatography. A rapid, sensitive, and specific technique. *J. Biol. Chem.* 257:11235-11240.
- De Dios, I., Manso, M., Leon, V. y Lopez Borrasca, A. 1986. Separation of human lymphocyte subclasses by rosettes with latex-lectin particles. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 35:12-17.
- De Petris, S. y Takacs, B. 1983. Relationship between mouse lymphocyte receptors for peanut agglutinin (PNA) and *Helix pomatia* agglutinin (HPA). *Eur. J. Immunol.* 13:831-840.
- Gillespie, W., Paulson, J.C., Kelm, S., Pang, M. y Baum, L.G. 1993. Regulation of alpha 2,3-sialyltransferase expression correlates with conversion of peanut agglutinin (PNA)+ to PNA- phenotype in developing thymocytes. *J. Biol. Chem.* 268:3801-4
- Goldstein, I.J., Hughes, H.C., Monsigny, M., Osawa, T. y Sharon, N. 1980. What should be called a lectin? *Nature.* 285: 66.
- Guzman-Partida, A.M., Robles-Burgueno, M.R., Ortega-Nieblas, M. y Vazquez-Moreno, L. 2004. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. *Biochimie.* 86:335-342.
- Hossler, P., Khattak, S.F. y Li, Z.J. 2009. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology.* 19: 936-949
- Kocourek, J. y Horejsí, V. 1981. Defining a lectin. *Nature.* 290:188.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lascurain, R., Porras, F., Baez, R., Chavez, R., Martinez-Cairo, S., Alvarez, G. Y Zenteno, E. 1997. *Amaranthus leucocarpus* lectin recognizes human naive T cell subpopulations. *Immunol. Invest.* 26: 579-587.
- Leavitt, R.D., Felsted, R.L. y Bachur, N.R. 1977. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *J. Biol. Chem.* 252:2961-2966.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J. y Wyns, L. 1998. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1383: 9-36.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. 1951.

- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Merant, C., Messouak, A., Cadore, J.L. y Monier, J.C. 2005. PNA-binding glycans are expressed at high levels on horse mature and immature T lymphocytes and a subpopulation of B lymphocytes. *Glycoconj J.* 22:27-34.
- Moreno, F.B.M.B., De Oliveira, T.M., Martil, D.E., Vicoti, M.M., Bezeira, G.A., Abrego, J.R.B., Cavada, B.S. y De Azevedo, W.F. 2008. Identification of a new quaternary association for legume lectins. *J. Struct. Biol.* 161:133-143.
- Motoyoshi, F., Kondo, N. y Orii, T. 1990. Appearance of bisected N-acetylglucosamine residue of biantennary sugar chains and decrease of high molecular weight oligosaccharides of human lymphocytic cell membranes during differentiation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54:495-499.
- Ortiz, B., Porras, F., Jimenez-Martinez, M.C., Montano, L.F., Martinez-Cairo, S., Roberts, D.D., Etzler, M.E. y Goldstein, I.J. 1982. Subunit heterogeneity in the lima bean lectin. *J. Biol. Chem.* 257:9198-9204.
- Porras, F., Urrea, F., Ortiz, B., Martinez-Cairo, S., Bouquelet, S., Martinez, G., Lascrain, R. y Zenteno, E. 2005. Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1724:155-162.
- Reisner, Y., Ravid, A. y Sharon, N. 1976a. Use of soybean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72:1585-1591.
- Reisner, Y., Linker-Israeli, M. y Sharon, N. 1976b. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. *Cellular Immunology.* 25:129-134.
- Roberts, D.D., Etzler, M.E. y Goldstein, I.J. 1982. Subunit heterogeneity in the lima bean lectin. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Sampson, N.S., Mrksich, M. y Bertozzi, C.R. 2001. Surface molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:12870-1
- Sharon, N. y Lis, H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 246:227-234.
- Urbano-Hernández, G. 2007. Identificación de estructuras glicosídicas reconocidas por la lectina PF2 en fetuina y tejidos linfoides. Tesis de doctorado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Sonora, México.
- Van Damme, E.J., Van Leuven, F. y Peumans, W.J. 1997. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. *Glycoconj J.* 14:449-456.
- Vázquez-Moreno, L., Ortega-Nieblas, M., Robles-Burgueño, M.R. y Ramos-Clamont, G. 2000. Purification of complex carbohydrate specific lectins from *Olnya tesota* seeds using tandem affinity chromatography. *Int. J. Bio-chromatogr.* 5:83-90.
- Wu, W., Harley, P.H., Punt, J.A., Sharrow, S.O. y Kearse, K.P. 1996. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. *J. Exp. Med.* 184:759-764.
- Zenteno, E., Ochoa, J.L., Parra, C., Montañón, M., Ruiz, B. y Carvajal, R. 1985. *Machaerocereus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectins: biological activity on immune response cells. En *Lectins Biology, Biochemistry Clinical Chemistry*. Vol. 4. T. C. Hansen y J. Breborowicz (ed.), pp 437-445. Ed. W. de Gruyter, Berlin.