

0038142
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**INFLUENCIA DE LAS LECTINAS EN EL
CRECIMIENTO IN VITRO DE FIBRAS
NERVIOSAS EMBRIONARIAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

SYLVIA LETICIA VERDUGO DÍAZ

26-1093

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ RAÚL DRUCKER COLÍN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION

DISCONTINUA

RESUMEN

El presente trabajo de tesis describe los resultados experimentales obtenidos sobre el crecimiento *in vitro* de neuronas sensoriales de embrión de pollo, expuestas a la acción de diversas lectinas vegetales, tanto en forma de compuesto soluble como de componente de la matriz extracelular. Los resultados son comparados con los datos bibliográficos sobre el efecto de las lectinas naturales en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario de los vertebrados. Dentro de estas lectinas se encuentran aquellas que forman parte integral de las membranas neuronales, en este caso tenemos a la NCAM, proteína muy estudiada por su papel regulador durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso. En segundo lugar tenemos a las lectinas liberadas dentro del espacio extracelular, lugar en donde pueden seguir varios caminos, en primer lugar pueden unirse a los glúcidos membranares de las células blanco e intervenir como puentes de reconocimiento (por ejemplo: la ligantina, la entrancina, etc). Otras de ellas pueden formar parte integral de la matriz extracelular y actuar así como guías para el crecimiento (por ejemplo las galectinas). Por último tenemos a las lectinas liberadas al espacio extracelular, pero que su tipo de interacción entre células es similar al de los factores tróficos, es decir como factores solubles. Entre estas últimas en nuestro laboratorio hemos descrito la presencia de DARP (Dopamine Releasing Protein) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes humanos con diferentes desórdenes neurológicos (Verdugo-Díaz, L. y cols, 1997). Esta proteína por su forma de actuar y su estructura química ha sido descrita como una lectina animal que al ser liberada al espacio extracelular regula entre otras funciones el crecimiento de las células dopaminérgicas del sistema nervioso de vertebrados.

Los resultados experimentales muestran los efectos de diversas lectinas sobre el desarrollo de neuronas ganglionares espinales de embrión de pollo *in vitro* por medio de un análisis cuantitativo multiparamétrico. Las lectinas fueron agregadas en solución al medio de cultivo o fueron colocadas como sustrato de cultivo. De los resultados obtenidos se pueden distinguir dos clases de lectinas de acuerdo a las modificaciones obtenidas en el crecimiento de fibras nerviosas. La primera clase, aquellas que favorecen el desarrollo neuronal que corresponde a las lectinas con especificidad mayor de tipo glucosa-manosa (Con A, LCA y PSA). La segunda clase, que al contrario de la anterior inhibe o retrasa el crecimiento de fibras nerviosas comprende a varias lectinas (WGA, PNA, PWM, UeAf, etc.) con muy diversas especificidades a glúcidos (fucosa, glucosamina, etc.).

El conjunto de estos resultados propone que la presencia de glúcidos membranales juegan un papel importante en el desarrollo de células nerviosas. En particular, que la presencia de grupos manosídicos favorece el crecimiento y la bifurcación neurítica. Estos resultados fueron confirmados con la exposición de cultivos a enzimas específicas de la unión manosídicas y con la inhibición competitiva con azúcares específicas.

En conclusión, la presencia diferencial de compuestos glucosilados en las neuronas y en su medio ambiente local, es un factor determinante durante la ontogenia neuronal. Estos compuestos son reconocidos por lectinas específicas que pueden tener a su vez expresión diferencial espacio-temporal durante el proceso de desarrollo y maduración.

INTRODUCCIÓN

La diversidad funcional desarrollada por el sistema nervioso de los vertebrados depende de manera directa de la compleja red de conexiones nerviosas que se generan durante el desarrollo embrionario. Una de las primeras etapas de este proceso de desarrollo es el crecimiento del axon hacia las células blanco. La precisión con la cual las neuronas seleccionan las vías y forman las conexiones a través de los diferentes tejidos es determinada en gran medida por el cono de crecimiento.

1). CONO DE CRECIMIENTO Y MATRIZ EXTRACELULAR.

El cono de crecimiento (parte localizada en el extremo de las prolongaciones nerviosas) es una estructura con gran movilidad, que responde a las señales locales del medio ambiente como un sistema receptor-efector, controlando así las diversas actividades celulares (migración, elongación axonal, sinaptogénesis, mielinización, etc.). Estudios realizados tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro* han mostrado que la forma y el comportamiento (extensión, dirección, retracción, etc.) del cono de crecimiento varían considerablemente en función del contexto celular y matricial en el cual se encuentre (Bray y Hollenbeck, 1988).

En la actualidad, se considera que diversos factores del medio ambiente en el cual se desarrollan las neuritas son los principales mecanismos que inducen la direccionalidad de las mismas. Entre los factores de direccionalidad más estudiados se encuentran:

- a). las moléculas difusibles específicas, las cuales ejercen una direccionalidad sobre ciertos tipos de neuronas (factores quimiotáctiles). Entre la gran variedad de moléculas de este tipo, tenemos como ejemplo clásico al factor de crecimiento nervioso (NGF), el cual no solo actúa como un factor direccional sino que es conocido fundamentalmente como un factor trófico (Levi-Montalcini y Angeletti, 1968). La lista de factores de este tipo es muy grande y no deja de agrandarse día con día (ver revisiones de Barde, 1983, 1987, 1988; Davies, 1988; Tolkovsky, 1997).
- b). las variaciones locales de adhesión debidas a moléculas fijas en las superficies celulares (integrinas, CAM's, etc.) (Edelman, 1976; 1984; 1985; Lander, 1989; Matsumoto y cols., 1990).
- c). las variaciones físicas del medio ambiente celular (textura, forma, etc.), así como las propiedades adhesivas de ese medio (haptotaxia) (Letourneau, 1975; Saxod y Bizet, 1988).
- d). la inhibición de contacto entre los conos de crecimiento neuronal y ciertos tipos celulares (Crain y Peterson, 1982; Caroni y Schwab, 1988).

e). la matriz extracelular

La matriz extracelular puede definirse como el substrato natural, en el cual las células migran, proliferan y se diferencian *in vivo* (Rutka y cols., 1988). Esta estructura se compone de múltiples macromoléculas de origen celular. La lista de compuestos moleculares que forman la matriz extracelular del sistema nervioso no deja de agrandarse día con día. Las moléculas de la matriz extracelular se clasifican en 4 grandes familias que son: las colágenas y moléculas asociadas, las glucoproteínas de tipo no colágena, los glucosaminoglicanos (GAG) y los proteoglicanos (PG). Dentro de las glucoproteínas de tipo no colágeno, la fibronectina (FN) y la laminina (LN) son las dos moléculas más estudiadas y con mayor ubicuidad en los sistemas vivos. Sin embargo, existen muchas otras moléculas que pertenecen a esta familia y que presentan distribuciones más restringidas. Por ejemplo, la entrancina, la ligantina y diversas lectinas han sido descritas como componentes de la matriz extracelular del sistema nervioso (Barondes, 1984; Carbonetto, 1984).

La matriz extracelular juega un papel fundamental en el comportamiento celular durante la ontogénesis nerviosa (Letourneau, 1979, 1983, 1987, 1992; Newgreen y cols., 1982; Thiery y cols., 1984; Carbonetto, 1984, 1987; Adler y cols., 1985; Lander y cols., 1982, 1983). Los componentes de la matriz extracelular involucrados en la adhesión y elongación neuronal así como los receptores de superficie para dichos componentes incluyen una amplia lista que aún se encuentra en estudio. Con base en los estudios *in vitro* se ha podido definir que algunos de estas moléculas promueven y otras inhiben o provocan la repulsión de los conos de crecimiento y por lo tanto la elongación neuronal. La Tabla I muestra una lista de las moléculas de la matriz extracelular que influyen en el crecimiento neuronal (modificada de Letourneau y cols., 1992). Los resultados que se presentaran en esta tesis se proponen como una nueva serie de moléculas (lectinas y moléculas asociadas) que influyen en el proceso de desarrollo neuronal y que se encuentran poco estudiadas (ver discusión).

Las moléculas transmembranales que actúan como receptores para las moléculas de la matriz extracelular son generalmente glucoproteínas. Algunas de ellas conforman familias de compuestos bien definidas (integrinas, citoadherinas, etc.) y poseen uno o varios dominios de reconocimiento para los compuestos de la matriz extracelular o para el reconocimiento entre células (CAMs). Un resumen no exhaustivo de las integrinas y otros receptores membranales se presenta en la Tabla I. Como puede verse en esta tabla, el número de integrinas se encuentra en crecimiento, sin embargo la estructura molecular y sus propiedades químicas han sido bien descritos. De ellos cabe remarcar que tanto la subunidad α como la β se encuentran glucosidadas en varios sitios, todos ellos presentes en la región extracelular. El papel que juegan los glúcidos en estas moléculas es incierto, por lo cual ha sido propuesto por algunos autores como un punto fundamental de estudio (Akiyama y cols., 1990; Turner y Burrige, 1991).

Tabla I. MOLÉCULAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y RECEPTORES MEMBRANALES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO NEURONAL.

MATRIZ EXTRACELULAR	COMENTARIOS
Laminina	Promueve el crecimiento, posee múltiples dominios.
Merosina	Promueve el crecimiento, anti-adhesiva.
S-Laminina	Promueve adhesión de neuronas motoras.
Fibronectina	Promueve el crecimiento, presente en SNC y SNP.
Colágeno IV	Mediador del crecimiento a través de la integrina NC1.
Trombospondina	Promueve el crecimiento, dependiente de la integrina y de la heparina.
Vitronectina	Promueve el crecimiento, dependiente de la integrina.
Tenascina	Promueve o inhibe el crecimiento dependiente de los dominios.
Axonina-1	Presente en neuronas y en matriz extracelular, se une a L1.
<i>Proteoglicanos promotores:</i>	
LN/HS-PG	Promueve el crecimiento.
Perlecan	Promueve el crecimiento y la adhesión.
CS-PG	Se colocaliza en neuritas en crecimiento, promueve el crecimiento neocortical.
HS-PG	Promueve el crecimiento.
DS-, CS-, HS-PG	Promueve el crecimiento mesencefálico.
<i>Proteoglicanos inhibitorios:</i>	
Clausrina	Inhibe la adhesión y el crecimiento.
CS-PG	Inhibe el crecimiento del ganglio de la retina, de la médula espinal, inhibe la invasión de DRG a epidermis y la regeneración cortical.
DS-PG	Presente en las placas neurofibrilares de pacientes con Alzheimer.
RECEPTORES	LIGANDOS
<i>Integrinas:</i>	
$\alpha 1\beta 1$	LN, Colágeno
$\alpha 2\beta 1$	Colágeno
$\alpha 3\beta 1$	LN, FN, Colágeno
$\alpha 4\beta 1$	FN
$\alpha 5\beta 1$	FN
$\alpha 6\beta 1$	LN
$\alpha ?\beta 1$	TSP
$\alpha v\beta 100k$	VN
$\alpha 8\beta 1$?
$\alpha L\beta 2$	I-CAM-1, I-CAM-2
$\alpha M\beta 2$	C3bi
$\alpha X\beta 2$?
$\alpha IIb\beta 3$	FN, VN, vWF, Fb
$\alpha V\beta 3$	VN, Fb, vWF, TSP
$\alpha V\beta 4$	FN, VN
$\alpha ?\beta ?$	FN, Fb, VN, vWF, colágeno tipo IV
<i>Otros:</i>	
Galactosiltransferasa	LN
Receptor de PTPasa	?
Amfoterina	HS/t-PA
HS-PG	LN, FN, factores de crecimiento
abreviaturas: SNC-Sistema nervioso central, SNP-Sistema nervioso periférico, CS-condroitina sulfato, LN-laminina, HS-heparan sulfato, PG-proteoglicano, CS-condroitin sulfato, DS-dermatan sulfato, DRG-ganglio de la raíz dorsal, FN-fibronectina, TSP-trombospondina, VN-vitronectina, PTPasa-protein tirosin fosfatasa, t-PA, plasminógeno activador de tejidos. Fb-fibrinógeno, vWF, factor von Willebrand.	

La adhesión celular a la matriz extracelular va acompañada frecuentemente por el reclutamiento de varios componentes del citoesqueleto, estructuras localizadas en la superficie ventral de las células cultivadas y que se han denominado como sitios de adhesión focal (Turner y Burridge, 1991). Estas interacciones se realizan entre ciertos miembros de la familia de las integrinas con los compuestos de la matriz extracelular. Por ejemplo, una vez que se da la adhesión celular *in vitro*, la talina se une por un lado a la fracción citoplásmica de la integrina y de otro lado a la vinculina. La vinculina a su vez interactúa con la α -actinina y esta con la actina. El mecanismo que se acaba de describir en forma muy resumida involucra otras proteínas estructurales (distrofina, la proteína de 58 kDa, etc.), enzimas (calpaina II, proteína cinasa C, pp60^{v-src}, etc.) y otras moléculas (paxilina, tenansina, zixina, etc.).

En resumen, los compuestos de la superficie celular, en particular los glicocojugados, sirven de código de superficie de la identidad celular y juegan así un papel esencial en la formación de las redes nerviosas (Pfenninger y Maylié-Pfenninger, 1979, 1981, 1984; Letourneau, 1983; Carbonetto y Argon, 1980; Collins y Lee, 1984; Edelman, 1985; Rutishauser, 1985; Lockerbie, 1987; Bray y Hollenbeck, 1988; Dodd y cols., 1986, 1988).

II). POLISACÁRIDOS MEMBRANALES.

La importancia que juegan los polisacáridos membranales en los diversos procesos biológicos ha sido menospreciada durante mucho tiempo. Sin embargo, durante los últimos años, numerosas investigaciones han puesto en evidencia el papel esencial de los azúcares constituyentes de las glucoproteínas y de los glucolípidos de la membrana celular. Los carbohidratos conformacionales presentan al menos dos grandes funciones. Al interior de la célula, ayudan a las proteínas a doblarse y sintetizarse correctamente en el retículo endoplásmico y pueden también actuar como una señal para la correcta migración de las glucoproteínas. Fuera de la célula, proveen las estructuras de reconocimiento específico para las interacciones con una gran variedad de ligandos externos (Gahmberg y Tolvanen, 1996).

A partir del modelo de membrana propuesto por Singer y Nicolson (1972) en el cual se representa a la membrana como un mosaico fluido dentro del cual proteínas y glucoproteínas flotan en la bicapa lipídica, el estudio de la disposición de los compuestos membranales, así como de sus interacciones, se ha desarrollado enormemente.

El reciente interés mostrado hacia los glúcidos membranales reside en el hecho de que todas las células vivas se encuentran recubiertas de azúcares. En esta posición estratégica, las funciones de los azúcares membranales pueden ser separadas en dos grandes tipos: las funciones de tipo estrictamente estructural y

las funciones (las menos estudiadas) que corresponden a diversos fenómenos biológicos, tales como los involucrados en las comunicaciones intercelulares y las desarrolladas entre las células y su medio ambiente (Muramatsu, 1989).

Los polisacáridos son estructuras complejas formadas por la unión de diversos azúcares simples, los cuales pueden estar unidos de manera estable y covalente a proteínas (glucoproteínas) o a lípidos (glucolípidos) de la membrana celular (Hakomori, 1981; Sharon y Lis, 1982). Su síntesis no depende exclusivamente de la información genética contenida en el DNA, sino que son el resultado de la acción sucesiva de numerosas enzimas. Así, se forman por la adición etapa por etapa de azúcares simples, bajo la acción de enzimas específicas denominadas glucosiltransferasas (Roseman, 1970; Shur, 1982; Rauvala y cols., 1983).

Los carbohidratos tienen un enorme potencial de almacenamiento de información biológica, ya que a diferencia de los péptidos y de los oligonucleótidos, la información de los carbohidratos se encuentra almacenada no sólo en el número y la secuencia de sus unidades monoméricas, sino también por la posición y la configuración anomérica que presentan dichas unidades y aún más por la presencia de bifurcaciones en la molécula. Esta diversidad tiene una importancia fundamental en fenómenos biológicos tan diversos como la adhesión celular, el crecimiento celular, la fecundación, las funciones inmunitarias, el reconocimiento de células blanco, la inhibición de contacto, etc. (Muramatsu, 1989).

La idea de que los azúcares que conforman los glucolípidos y las glucoproteínas, jueguen un papel fundamental en la transmisión de la información biológica surge a partir de su diversidad estructural. Esto puede ilustrarse al comparar el número de formas en que 3 moléculas de una hexosa simple pueden combinarse (teóricamente 176 veces), con el número de tripéptidos que pueden formarse por 3 moléculas de un simple aminoácido, o también con el número de codones formados por tres nucleótidos idénticos, los cuales únicamente son uno. A partir de este ejemplo se puede inferir que los monosacáridos constituyen las letras de un nuevo código de información y forman un tipo molecular fundamental en el reconocimiento celular (Sharon y Lis, 1989). Este reconocimiento puede mediarse por interacciones entre las partes sacáridas de los glucoconjugados y las moléculas fijadoras de azúcares a diferentes niveles: membranas celulares, compartimientos extra y/o intracelular, matriz extracelular, fluidos biológicos, etc.

En péptidos y oligonucleótidos, la información contenida se basa sólo en el número de unidades monoméricas y su secuencia, mientras que en carbohidratos, la información también es almacenada en la posición y la configuración anomérica (α y β) de las unidades glucosídicas y por la presencia de puntos de bifurcación. Así, dos moléculas de un simple monosacárido (por ejemplo glucosa) pueden unirse y formar 11 diferentes disacáridos, pero dos moléculas de un simple

aminoácido o un nucleótido puede solo formar un dipéptido o un dinucleótido respectivamente. Mas impresionante, cuatro monosacáridos diferentes pueden formar 35,560 tetrasacáridos diferentes, mientras que 4 aminoácidos diferentes o nucleótidos pueden formar solo 24 estructuras tetraméricas.

Las glucoproteínas, los glucolípidos y los proteoglicanos pueden estar constituidos por una gran variedad de monosacáridos (Tabla II). Sin embargo se observan ciertas preferencias entre éstas macromoléculas. Así, en glucoproteínas frecuentemente se identifican los ácidos polisiálicos y los residuos oligomanosídicos. Por otro lado, los ácidos glucurónicos sulfatados son los monosacáridos específicos de los proteoglicanos (Schachner y Martini, 1995).

Tabla II - GLUCOPROTEÍNAS, PROTEOGLICANOS Y GLUCOLÍPIDOS.

Monosacáridos constituyentes	Otros constituyentes		Localización
	comunmente	ocasionalmente	
GLUCOPROTEINAS			
Glucosa Galactosa Mannosa Glucosamina* Galactosamina* Ácido neuramínico* Fucosa	Núcleo protéico	Fosfato, sulfato	Secreciones, membranas celulares, matriz extracelular y tejido conectivo.
PROTEOGLICANOS			
Galactosa Xilosa Ácido glucurónico Ácido idurónico Glucosamina* Galactosamina*	Sulfato, núcleo protéico		Matriz extracelular y tejido conectivo.
GLUCOLÍPIDOS			
Glucosa Galactosa Glucosamina* Galactosamina* Ácido Neuramínico* Fucosa	Ceramida	Sulfato	Membranas celulares constituyentes meno- res del plasma.
* Siempre N-acetilado			
Abreviaturas: glucosa (glc), manosa (man), fucosa (fuc), galactosa (gal), N-acetilglucosamina (glcNAc), N-acetilgalactosamina (galNAc), ácido N-acetilneuramínico (neuNAc).			

Las interacciones entre los compuestos glucosilados pueden ser en superficies celulares (trans-interacción) y/o para el reconocimiento de moléculas en la superficie de la membrana de una misma célula (cis-interacción), formando complejos que influyen en las señales de transducción en el interior de la célula.

a). **Glucosilación de proteínas**

Existen cuatro grandes formas de glucosilación de proteínas, las cuales afectan la estructura y en muchos casos la función de la misma. Las primeras dos involucran interacciones intramoleculares entre el azúcar y la proteína. Las otras dos dependen principalmente de las interacciones intermoleculares (modificando la estructura local o modificando la actividad funcional de la proteína). En general, la unión de azúcares a proteínas induce un incremento en la rigidez de esta última y/o la protegen en sus sitios susceptibles de fragmentación (Waechter, 1988).

La glucosilación de tipo N se inicia por la terminal nitrogenada de las proteínas y es un evento co-translacional del polipéptido que emerge del ribosoma. Se lleva a cabo por la glucosilación de las secuencias: Asn-X-Ser/Thr. Antes de que la proteína se doble, la transferasa oligosacárida le transfiere un precursor de tipo: Glc3Man9GlcNAc2 proveniente de un acarreador dolicol que lo une al nitrógeno de la aspargina (Figura 1). Ciertos aminoácidos localizados en la cercanía del sitio de glucosilación impiden dicho fenómeno (ejemplo la prolina). No se produce esta inhibición, si dichos aminoácidos se localizan en el interior del péptido. Si la secuencia Asn-X-Ser/Thr se localiza muy cerca de la parte carboxi-terminal es menos eficiente de glucosidarse. De igual forma si la proteína se encuentra doblada o empaquetada (procesos que generalmente involucran puentes disulfuro) se impide su glucosilación (Opdenakker y cols., 1993).

La glucosilación de un sitio no determina la ocupación de otra secuencia de la misma proteína. Por último el medio ambiente interno y externo de la célula y el estado de desarrollo de la misma son factores que influyen en la glucosilación.

Otro fenómeno relacionado con la glucosilación de tipo N es una modificación secundaria de la cadena de oligosacáridos que fué primariamente unida a la proteína. Este evento es también de tipo co-translacional y ocurre en el retículo endoplásmico rugoso. Se inicia por la extracción de 3 glucosas por exoglucosidasas quedando así unido el polisacárido Man9GlcNAc2. En segundo lugar se da un doblamiento de la proteína que protege a la molécula de ser atacada por una serie de manosidasas presentes en el aparato de Golgi o bien es secretada fuera de la célula. Así pues, con los procesos de glucosilación y modificación de las cadenas glúcidas secundarias, una proteína puede presentar en un sitio determinado un tipo de oligosacárido y otro muy distinto en otro lugar de la misma proteína.

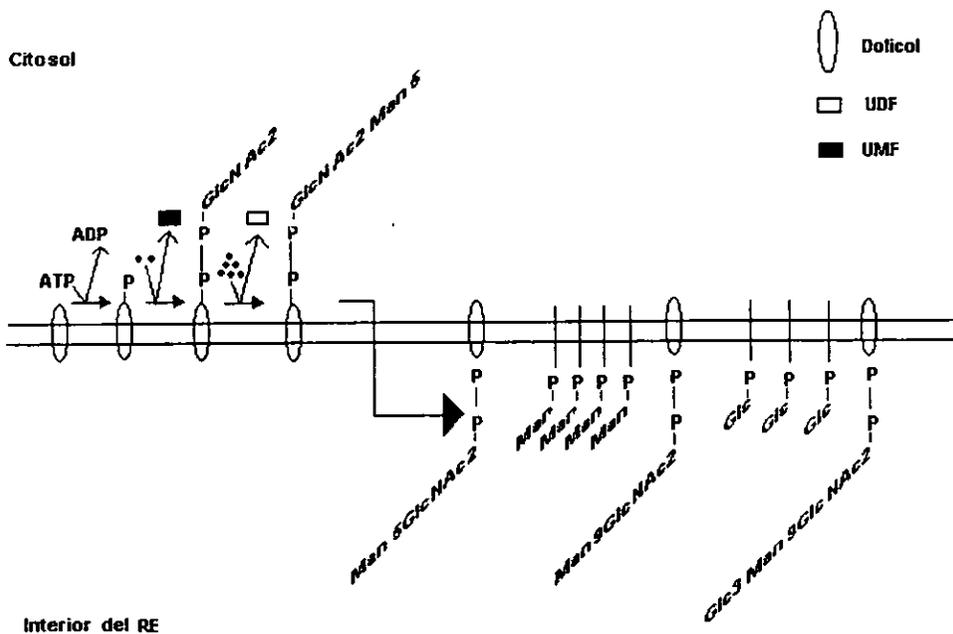
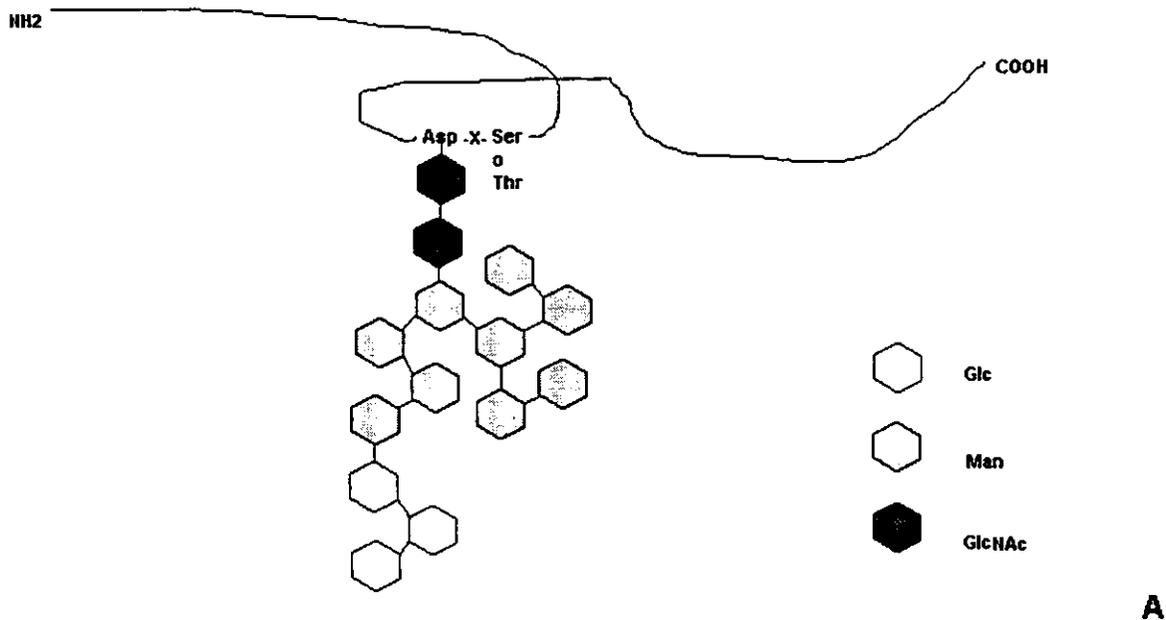


Figura 1 - GLUCOSILACION DE PROTEÍNAS DE TIPO N.

A - Oligosacárido primario de las glucoproteínas formado por 3 glucosas, 9 manosas y 2 N-acetilglucosamina.

B - Proceso de unión de los monosacáridos al grupo dolicol durante la N-glucosilación de proteínas en el retículo endoplásmico (RE).

Otra forma de glucosilación de proteínas, la cual se presenta con menos frecuencia, es la denominada unión de tipo O (O-linked). En este mecanismo, los oligosacáridos se unen a través del oxígeno de la serina o de la treonina por la adición post-translacional enzimática o por ciertos monosacáridos que se unen directamente a la proteína, los cuales generalmente empiezan con una N-acetilgalactosamina. Esta unión a la proteína se realiza a través de la serina o la treonina en la secuencia GlyGlySer/Thr

A partir de estas dos formas de glucosilación de proteínas (tipo N y O), los sacáridos constituyentes pueden modificarse a base de glucosiltransferasas y formar oligosacáridos híbridos con la combinación de dos o más los monosacáridos descritos en la tabla II.

Usando mutantes en la glucosilación, Stanley y colaboradores (1995) han mostrado sin lugar a dudas que la N-glucosilación es esencial para la viabilidad celular, pero que los oligosacáridos híbridos y complejos no son absolutamente necesarios.

En resumen, la glucosilación es un mecanismo celular que permite la modificación de múltiples proteínas sin recurrir al genoma y de esta manera la célula puede responder de forma más flexible a cambios transitorios que ocurren durante su ciclo celular y durante el desarrollo del organismo. Por ejemplo, durante el embarazo se altera la glucosilación de las IgG observándose al final del embarazo que casi todas las IgG se encuentran galactosiladas.

A pesar de la complejidad bioquímica de los azúcares, actualmente se dispone de múltiples métodos de experimentales para su detección, los cuales son utilizados tanto para su estudio estructural como funcional. Así por ejemplo, las glucoproteínas membranales pueden ser detectadas con la ayuda de:

- anticuerpos específicos (Fox y cols., 1981; Dodd y cols., 1988),
- glucosidasas, enzimas que cortan específicamente la unión química entre ciertos azúcares (Hankins y Shanon, 1978; Hankins y cols., 1980),
- glucosiltransferasas (Roseman, 1970; Shur, 1982; Rauvala y cols., 1983) y
- lectinas, proteínas no enzimáticas que reconocen de forma precisa ciertas estructuras glúcidas (Alroy y cols., 1984). Estas últimas al poseer la característica de unirse específicamente a los glúcidos sin modificarlos, son un tipo de herramienta muy útil en la identificación de determinadas azúcares membranales (Monsigny y cols., 1978).

III). LECTINAS

El término lectina fue utilizado por primera vez en 1954 por Boyd y Shapleigh, para designar a un tipo de moléculas bien definidas. La palabra lectina proviene del latín "*legere*": escoger, debido a que una lectina es capaz de aglutinar selectivamente cierto tipo de células, fijándose específicamente sobre los receptores de la superficie celular. A pesar de que el término se acuñó hasta los años 50's las lectinas ya habían sido observadas desde el siglo pasado en plantas y por ello fueron denominadas: fitoaglutininas (Lis y Sharon, 1986). Actualmente las lectinas han sido detectadas en todos los organismos vivos desde bacterias hasta mamíferos (Zalik y Milos, 1986).

Las definiciones propuestas para las lectinas son muy variadas y dependen del avance en su caracterización estructural y funcional. Así, Goldstein y colaboradores (1980) propusieron la siguiente definición: "una lectina es una proteína o glucoproteína que no es formada de un proceso inmunológico, que aglutina células y que precipita glucoconjugados". Ellas tienen al menos dos sitios de fijación y su especificidad está normalmente definida por los monosacáridos u oligosacáridos simples que inhiben la aglutinación inducida por una lectina (Tabla IV).

Por su parte Kocourek y Horejsi (1981) proponen que las lectinas son proteínas que se unen a azúcares o glucoproteínas con un origen no inmunológico, desprovistas de actividad enzimática respecto a los azúcares que reconocen y que poseen al menos un sitio de reconocimiento. Esta definición introduce un cambio respecto a los sitios de reconocimiento y con ella quedan incluidas las lectinas monovalentes.

Barondes (1988) considera que una lectina es una proteína que se une a carbohidratos de forma y función diferente a las enzimas o los anticuerpos. Esta es una definición no restrictiva que se adapta ampliamente a las lectinas endógenas de los vertebrados (Caron y cols., 1990).

A pesar de no existir aún una definición general que abarque todas las moléculas con función de lectina, éstas han sido clasificadas dependiendo con base en sus características funcionales y estructurales.

a). Clasificación de lectinas

A pesar de que las lectinas presentan una amplia diversidad funcional, es posible agrupar la mayoría de ellas en distintas familias de proteínas homólogas que posean propiedades estructurales similares (Tabla III). La mayor y mejor caracterizada de estas familias es la correspondiente a las lectinas de las leguminosas (Lis y Sharon, 1986; Sharon y Lis, 1989). La segunda clase comprende a las lectinas de los cereales, la cual es mucho más pequeña y donde sólo ha sido caracterizada a la lectina del trigo WGA (Sharon, 1993). Las otras

Tabla III - CLASIFICACIÓN DE LECTINAS VEGETALES Y ANIMALES

Tipo de Lectina	Especificidad	Peso Molecular/ subunidad (kDa)	No. subunidades	Sitios de unión por subunidad	Puentes disulfuro	Iones	Localización	Ejemplos
PLANTAS:								
Legumbres	Diversa	25-30	2 o 4	1	-	Ca ²⁺ Mn ²⁺		PSA (chícharo) LCA (lenteja) PNA (cacahuete) haba, frijol, etc.
Cereales	GlcNAc,	18	2	2	++	-		WGA (trigo)
ANIMALES:								
Tipo C	Man, Gal, Fuc, tetra- sacárido de heparina	>>15*	variable CRD conservado	1-8	+	Ca ²⁺	extracelular soluble	Proteínas fijadoras de manosas, conglutinin, proteína surfactante del pulmón, proteína reactiva C, selectinas (LPE), colectinas, receptor asialo-glucoproteína etc.
Tipo S (Galectinas)	β-Gal	14-15	variable CRD conservado	1	-	-	soluble	Galectinas (1 a 8),
Tipo Pentraxina	β-Gal, Gal, monosacáridos sulfatados o fosforilados	50	sí en arreglo penta- mérico			Ca ²⁺ Mn ²⁺		Pentraxinas
Tipo I	Man6GlcNAc2, epitope HNK-1, ácido hialurónico, a2,3/a2,6 sialil lactosa		sí CRD tipo inmunoglobulina				membranal	I-CAM, N-CAM, glucoproteína Po, glucoproteína asociada a la mielina (MAG), sialoadhesina
Tipo P	glucoproteínas con man 6 fosfato	46	sí similar pero no el CRD típico				-	receptor manosa 6 fosfato, receptor IGF II

* Lectinas con el sitio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) de aproximadamente 120 aminoácidos en asociación con otros dominios.

familias corresponden a las lectinas de origen animal que serán analizadas en siguientes secciones. Sin embargo, cabe resaltar que como señala Drickamer (1988), las estructuras primarias de las lectinas animales no tienen ninguna relación con las lectinas vegetales, con lo cual el autor concluye que la habilidad de estas proteínas de reconocer carbohidratos evolucionó independientemente durante el proceso filogenético por múltiples caminos evolutivos. Es decir, las lectinas animales y vegetales no sólo son diferentes estructuralmente sino que también tienen sitios de reconocimiento diferentes.

Durante los últimos años, las estructuras tridimensionales de una treintena de lectinas animales y vegetales han sido elucidadas por técnicas de cristalografía de rayos X de alta resolución, así como también se ha mostrado su sitio de reconocimiento (Blanck y cols., 1996; Rini, 1995; Weis, 1992, 1996; Weis y cols., 1992). Estos resultados dan sustento experimental a la hipótesis de la evolución diferencial propuesta por Drickamer. Pero a su vez, estos mismos resultados han sido interpretados por otros autores como sustento en la idea de una relación entre las lectinas de plantas y de animales de las lectinas de leguminosas y las pentraxinas animales (Fiedler y Simons, 1994). Los autores apoyan sus conclusiones mostrando que a pesar de la poca semejanza en la secuencia primaria de las lectinas, éstas presentan grandes semejanzas en su estructura tridimensional que permiten emparentar ejemplos específicos.

✓ 1. LECTINAS VEGETALES

Más de 70 lectinas de diversas plantas de leguminosas han sido aisladas y más de 30 de ellas han sido caracterizadas bioquímicamente. A pesar de su variabilidad en los carbohidratos que reconocen, las propiedades fisicoquímicas que presentan son muy semejantes. Todas ellas consisten de 2 a 4 subunidades de 25 a 30 KDa con un sitio de reconocimiento a glúcidos en cada una de dichas subunidades. La unión a azúcares requiere de iones de calcio y magnesio (o algún otro ion metálico). La homología entre sus aminoácidos es notable, con más de 20% de residuos aminoácidos invariables, que incluyen en algunos casos el sitio de unión a carbohidratos y en casi todas ellas la complementariedad con los iones. Los aminoácidos que coordinan la unión con los iones incluyen al ácido aspártico y la asparagina, para dicha unión se forman puentes de hidrógeno con el monosacárido en el sitio de reconocimiento. Además de mantener la integridad de las subunidades constituyentes de las lectinas, los iones ayudan a mantener los aminoácidos en posición adecuada para el reconocimiento de los carbohidratos, pero no tienen una interacción directa con ellos. De las lectinas de leguminosas estudiadas, siete puentes de hidrógeno mantienen la posición del monosacárido en su sitio de reconocimiento.

De las lectinas de los cereales, solo se ha caracterizado bioquímicamente a la WGA (Wright, 1989), la cual está formada por un dímero con 2 subunidades idénticas

de 18 KDa. Cada subunidad posee 16 puentes disulfuro que le dan una gran estabilidad. Una característica distintiva que no se encuentra en ninguna otra lectina, es la existencia de al menos dos independientes y no cooperativos sitios de unión de carbohidratos por subunidad.

2. LECTINAS ANIMALES

En animales, las lectinas endógenas han sido clasificadas en dos tipos principales de acuerdo a su localización en las estructuras: las lectinas solubles en los líquidos biológicos y las lectinas unidas a las membranas celulares. Abundantes ejemplos de lectinas solubles han sido publicados en invertebrados (Yamada y Akeda, 1932; Komano y cols., 1983; Vasta y Marcholonis, 1983) y tanto en embriones como en adultos de vertebrados (Barondes, 1984; Kawasaki y Ashwell, 1976; Koliber y Barondes, 1977, 1978, 1979; Kitamura, 1980; Rutherford y Cook, 1981; Zalik y cols., 1983, 1987).

Históricamente, la especificidad de los monosacáridos a los que reconocen las lectinas ha dominado en la clasificación de las lectinas en general. Sin embargo, esta clasificación no refleja necesariamente las relaciones evolutivas entre ellas y se ha reemplazado por clasificaciones donde se toma en cuenta las bases de datos de las secuencias de aminoácidos de las proteínas y los dendogramas con ellas construidos (Gabijs, 1997).

Así, con base en estudios estructurales y funcionales, las lectinas animales en vertebrados fueron originalmente clasificadas por Drickamer (1988) en dos grandes tipos. El primer tipo denominado tipo C, por su dependencia de los iones calcio y el segundo denominado tipo S, las cuales no dependen del calcio, sino de los grupos tioles. Las lectinas tipo C, las cuales presentan actividad fijadora de carbohidratos-dependiente de calcio, contienen un dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) homólogo al que fué identificado primero en el receptor asialoglucoproteína de hígado. Este CRD tipo C se ha detectado en una amplia variedad de moléculas solubles y membranales, por ejemplo: las proteínas fijadoras de manosa en el hígado y en el suero, la apoproteína SP28-36 surfactante de pulmón, el receptor de linfocitos para la porción Fc de la IgE, el esqueleto de proteoglicano en fibroblastos y cartílago (Tabla III).

Las lectinas dependientes de Ca^{2+} , se localizan en suero, matriz extracelular y membranas (Tabla III). Todas tienen una secuencia común consistente de 14 aminoácidos invariables y de 18 aminoácidos altamente conservados en el segmento 115-130 que constituye el CRD tipo C. Ya que cada CRD se une a su ligando de una forma dependiente de Ca^{2+} , la arquitectura completa de estas lectinas esta definida por la forma en la cual cada CRD se combina con otros dominios, los cuales determinan muchas de las funciones de las lectinas (Drickamer, 1993).

El segundo tipo de lectinas de vertebrados, fueron denominadas tipo S por los requerimientos determinados experimentalmente por agentes tiol reductores para

mantener su actividad fijadora sacárida *in vitro*. Estas lectinas no parecen estar glucosiladas y se describen como proteínas solubles, ya que pueden aislarse de células y tejidos sin necesidad de detergentes. Muchas lectinas tipo S tienen especificidad para β -galactoside y pertenecen a una familia de proteínas relacionadas estructuralmente, denominadas también: electrolectinas, galaptinas, lectinas de lactosa, lectinas S-lac (solubles fijadoras de lactosa) y gal-lectinas (Barondes y cols., 1994).

Las lectinas de tipo C se subdividen con base en su estructura primaria y su dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) en 4 categorías. El primer grupo incluye proteínas unidas con proteoglicanos y con especificidad por galactosa y fucosa. El segundo grupo incluye los receptores tipo II que son proteínas integrales de membrana, como los receptores asialoglucoprotéico, el receptor IgE-Fc, la lectina de macrófagos. Todas ellas tienen especificidad por Gal/Fuc, Gal/GalNAc o GlcNAc. El tercer grupo también llamado "colectinas", está formado por lectinas en las cuales su dominio CRD se conecta a secuencias tipo colágeno y pertenecen a este grupo las lectinas que unen manosa del suero e hígado, la proteína surfactante pulmonar SP-A y la conglutinina bovina. Los monosacáridos específicos de este grupo son manosa, fucosa, GlcNAc y galactosa. El grupo IV está constituido por moléculas de adhesión celular conocidas como LEC-CAMs específicas para ácido siálico y fucosa.

Las lectinas de tipo S se clasifican en 3 subgrupos: el tipo proto, el chimera y el repetitivo. El primer subgrupo incluye la bien caracterizada lectina 14 KDa galaptina, ampliamente distribuida en el medio animal desde esponjas hasta mamíferos. Estas lectinas forman dímeros y cada subunidad tiene un sitio de reconocimiento. El tipo chimera comprende lectinas que sólo se han descrito en mamíferos y son las que antes se clasificaban como 29 y 35 KDa β -galactosides. Entre las más conocidas están la CBF35, el receptor de elastina/laminina, la Mac2 de macrófagos y la proteína que se une a la IgE. En el tipo repetitivo sólo se han descrito 2 miembros la lectina 32 KDa de *C. elegans* y la 36 KDa del intestino de rata.

Otra clasificación propuesta por Harrison (1991) para las lectinas de tipo S, β -galactosides o galaptinas, fue realizada por el autor de acuerdo a su peso molecular en 4 grupos: 14×10^3 , $16-22 \times 10^3$, $29-35 \times 10^3$ y 67×10^3 . El primer y tercer grupo corresponde al tipo proto y chimera de la clasificación de Hirabayashi y Kasai (1993). En el segundo subgrupo se encuentran algunos miembros del tipo repetitivo y el subgrupo de 67×10^3 sólo posee un miembro: el receptor de elastina/laminina. Sin embargo, como mencionamos con anterioridad, esta clasificación tampoco da una imagen evolutiva y las relaciones estructurales entre las diferentes lectinas, por lo cual actualmente no es muy aceptada.

Las pentraxinas de vertebrados son una familia de proteínas bien definidas con propiedades de tipo lectina, como es el reconocimiento de carbohidratos y estructuras relacionadas y su dependencia de los cationes divalentes. Algunos autores sugirieron considerar a las pentraxinas como parte de un tercer grupo de lectinas animales (Tabla III).

La más reciente clasificación realizada para las lectinas animales, considera cinco grupos de ellas. Esta clasificación se encuentra publicada en la revisión de Gabius en 1997 y se consideró para construir la tabla III. Esta clasificación toma en cuenta el dominio de reconocimiento (CRD), como un requisito para considerar a una proteína como una lectina, además de la homología en su estructura primaria.

Por último existen ciertas lectinas descritas en invertebrados que no tienen ninguna similitud con las lectinas clasificadas y por lo tanto constituirían un último grupo de lectinas animales (no consideradas en la tabla III). Ejemplos de estas lectinas las encontramos en las esponjas y en el embrión del erizo (Drickamer, 1995).

b). Mecanismo de reconocimiento de carbohidratos

Con base en estudios bioquímicos y de cristalografía se han descrito los sitios de reconocimiento y los mecanismos de acción de las lectinas tipo C, es decir aquellas que presentan CRD bien reconocidos.

Estructura del dominio de reconocimiento de carbohidratos. La estructura de las CRD se caracteriza por la presencia de una pequeña cantidad de estructuras secundarias regulares, las cuales se confinan a los dos tercios inferiores del dominio, mientras que el tercio superior consiste de un segmento continuo del polipéptido doblado en una serie de cuatro asas. Estas asas forman los sitios de unión para dos iones de Ca^{2+} . El dominio se estabiliza con dos puentes disulfuro. Los residuos altamente conservados incluyen cuatro cisteínas que forman los dos puentes disulfuro. Además muchos de los ligandos de Ca^{2+} , consisten de ácido glutámico, del ácido aspártico y de la aspargina conservados en todos los CRD de tipo C.

Unión al ligando. La interacción entre el CRD y el azúcar se limita a una pequeña porción de la proteína cercana del Ca^{2+} . Comparando las secuencias de CRDs con actividad fijadora de azúcares se releva la presencia conservada de tres de los cinco ligandos para Ca^{2+} : Asp206, Asn205 y Glu193. Los otros dos ligandos, encontrados en la secuencia Glu-Pro-Asn, están siempre presentes en lectinas con ligandos similares a los que unen la proteína fijadora de manosa, pero la secuencia es invariablemente cambiada a Gln-Pro-Asp en lectinas que unen a galactosa.

c). Papel biológico de las lectinas animales

El reconocimiento es un evento central de una gran variedad de fenómenos biológicos y el primer paso en numerosos procesos basados en las interacciones célula-célula como son la fertilización, la embriogénesis, la migración celular, la formación de órganos, la defensa inmunitaria y la infección microbiana (Liewner y cols., 1986). El funcionamiento inadecuado del reconocimiento celular puede causar enfermedades. Así, defectos en leucocitos y en la adhesión plaquetaria provoca infecciones bacterianas recurrentes y sangrado mucoso respectivamente. Por otro lado,

el reconocimiento celular aberrante se piensa recae en el crecimiento celular incontrolado y motilidad que caracteriza a la transformación y la metastasis. Por lo tanto el entendimiento de las bases moleculares del código célula-superficie, tiene implicaciones en muchas áreas de la biología y la medicina (Sharon y Lis, 1989).

El reconocimiento celular puede ser esquematizado como el modelo de llave-cerradura, formulado originalmente por Emil Fischer en 1897 (en Vasta y cols., 1994) para las interacciones específicas entre enzimas y sustratos. Esta hipótesis fué extendida años más tarde para describir las interacciones entre células con moléculas solubles y con otras células respectivamente. Durante las últimas dos décadas la atención se ha centrado en la posibilidad que estos reconocimientos puedan estar mediados en parte por carbohidratos y lectinas.

La expresión de lectinas y de polisacáridos en sistemas biológicos presenta cambios característicos que coinciden con los cambios fisiológicos o patológicos distintivos durante la vida de las células o los diferentes tejidos estudiados.

Típicamente, las lectinas y los carbohidratos complementarios se localizan en la superficie de las células opuestas, las cuales pueden ser del mismo tipo o de diferente tipos (Figura 2). Las células pueden también interactuar vía puentes formados por glucoproteínas solubles que se unen a las lectinas de la superficie celular. Alternativamente, las lectinas pueden combinarse con carbohidratos de componentes insolubles de la matriz extracelular que promueven la adhesión célula-sustrato. Además, las lectinas solubles pueden actuar como puentes de unión a carbohidratos de células opuestas.

A pesar de que el descubrimiento de la existencia de las lectinas se remonta a más de un siglo, su papel biológico es aún en la actualidad poco conocido. La idea de la participación de las lectinas en las funciones biológicas tales como el reconocimiento intercelular, la diferenciación celular y el desarrollo embrionario nació a partir de los resultados obtenidos en mixomicetos (Rosen y cols., 1973) y en esponjas (Muller y cols., 1976; Burger y cols., 1978) en los cuales la aparición de las lectinas en la superficie celular induce la formación de organismos multicelulares.

En los vertebrados, las lectinas se han puesto en evidencia en diversos tejidos embrionarios. Así, en el cerebro de la rata, la aparición de una determinada lectina determina la sinaptogénesis (Simpson y cols., 1977) resultado similar fué descrito para el pollo (Koliber y Barondes, 1977).

Estas proteínas no-enzimáticas, fijadoras de azúcares, son un invaluable herramienta en el análisis estructural y funcional de los glucoconjugados de células animales por su habilidad en discriminar entre una gran variedad de complejas estructuras de carbohidratos que se encuentran en la superficie de células, en las matrices extracelulares y glucoproteínas solubles unidas a estas.

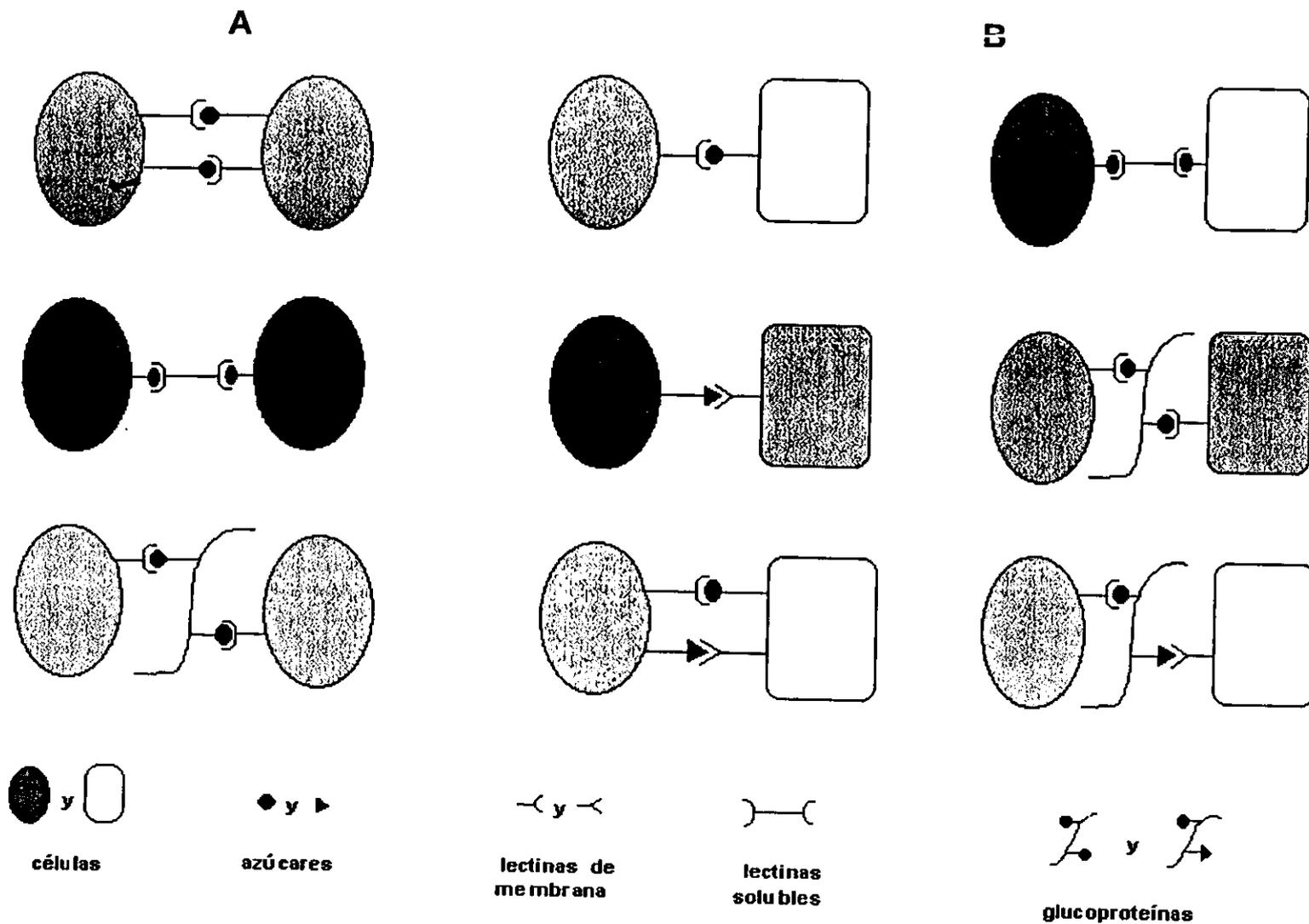


Figura 2 - DIFERENTES TIPOS DE INTERACCIONES MEDIADAS POR LAS LECTINAS ENTRE CÉLULAS Y/O MOLÉCULAS. ENTRE CÉLULAS DEL MISMO TIPO (A) Y ENTRE CÉLULAS DE DIFERENTE TIPO (B).

Así pues, los principios de glucobiología deben de ser analizados con más detenimiento a fin de poder entender los procesos biológicos en los cuales se encuentran involucrados las glucoproteínas, los glucolípidos y los PG, es decir los compuestos susceptibles de ser reconocidos por lectinas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Este estudio se realizó con el fin de contribuir en el análisis del papel de los glúcidos membranales en el desarrollo de las células nerviosas *in vitro*. El cultivo celular constituye un modelo simple y adecuado que permite el análisis, en un sistema aislado y controlado del comportamiento de las fibras nerviosas en crecimiento y de sus modificaciones bajo el efecto de agentes exógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Describir el crecimiento de explantes ganglionares de la cadena dorsal de embrión de pollo sobre diferentes sustratos de lectinas vegetales.

Determinar las cantidades de lectinas que se unen y liberan a una caja de cultivo durante un cultivo celular.

Observar el efecto de la manosidasa en el desarrollo *in vitro* de fibras nerviosas sobre un sustrato de Con A.

Inhibir el crecimiento neuronal de fibras nerviosas cultivadas sobre diferentes sustratos de lectinas por medio de azúcares específicas para cada lectina.

Describir el crecimiento de explantes ganglionares de la cadena dorsal de embrión de pollo en presencia de soluciones de lectinas vegetales en un sistema *in vitro*.

Observar la presencia de glúcidos membranales en neuronas sensoriales por medio de inmunomarcado con lectinas fluorescentes.

Correlacionar la presencia de glúcidos membranales con estructuras del citoesqueleto neuronal.

Cuantificar el crecimiento neurítico por medio de un análisis multiparamétrico.

Clasificar los diferentes sustratos de cultivo utilizados por medio de los resultados cuantitativos como moléculas que promueven o retardan el crecimiento neuronal.

Describir los datos reportados en la bibliografía respecto a los posibles papeles de las lectinas en el desarrollo embrionario de fibras nerviosas.

HIPÓTESIS

Los trabajos realizados con lectinas endógenas en sistemas animales han demostrado el papel fundamental que juegan estas proteínas en las interacciones intercelulares. Las propias lectinas y sus receptores celulares pueden regular además las interacciones matriz extracelular-célula (Barondes, 1984). En todos estos casos, las lectinas intervienen ya sea como proteínas de la superficie celular controlando las interacciones célula-célula y/o célula-matriz por la combinación de carbohidratos complementarios, o ya sea como compuestos solubles que reconocen los glúcidos membranales (Peacock y cols., 1990).

La regulación del crecimiento celular es un fenómeno crucial durante el desarrollo embrionario. Durante la embriogénesis del sistema nervioso, las neuronas modifican sus formas celulares en función de la matriz extracelular encontrada (Letourneau, 1975, 1979; Bray y Chapman, 1985). Diversos trabajos han mostrado la importancia de las lectinas en las primeras etapas del crecimiento nervioso, es decir, los fenómenos de adhesión y de unión celular (Hatten y François, 1981; Jousimaa y cols., 1984; Rauvala, 1984; De George y cols., 1987). Sin embargo, pocos estudios han sido consagrados al análisis del papel de las lectinas en el crecimiento neuronal (Chiquet y Acklin, 1986).

Así, si se utilizan lectinas vegetales con diferentes especificidades a monosacáridos como substratos de cultivo o como compuestos solubles en un modelo *in vitro* de crecimiento de neuronas embrionarias, entonces podrá determinarse por métodos cuantitativos y morfológicos, el papel de estos monosacáridos en el crecimiento de fibras nerviosas durante el desarrollo embrionario.

MATERIAL Y MÉTODOS

A). CULTIVOS CELULARES

El estudio del comportamiento de las fibras nerviosas en crecimiento se realizó con cultivos de explantes provenientes de ganglios dorsales de la médula espinal de embriones de pollo. Para el análisis cuantitativo del crecimiento celular se utilizaron cultivos de neuronas disociadas de los mismos ganglios sensoriales. Todos los cultivos se realizaron sobre cajas de Petri (Falcon, F-3001) de 35 mm de diámetro.

1.- Cultivo de explantes ganglionares.

Los explantes se obtuvieron de embriones de pollo de la raza Warren con 7-8 días de incubación. Los ganglios espinales fueron colectados del nivel lumbosacro y fueron separados del tejido conjuntivo con ayuda de pinzas.

Los ganglios se dispusieron sobre un pedazo de celofán previamente humedecido con medio de cultivo. El fragmento de celofán con los ganglios se colocó sobre el fondo de la caja de cultivo y se mantuvo fijo a ésta con el peso de un anillo de vidrio de 10 mm de diámetro (Figura 3). Después de 24 horas de cultivo, el anillo y el celofán se retiraron de la caja de cultivo.

Para esta serie experimental se utilizó el medio de cultivo libre de suero desarrollado por Bottenstein y cols. (1980). Este medio consiste de medio 199 (Gibco) adicionado de sales de Hanks y Hepes (25 mM) y enriquecido con factor de crecimiento neuronal (NGF) a una concentración de 10 ng/ml (Laref, Suiza), penicilina (125 U.I./ml, Sigma), glucosa (6 mg/ml), transferrina (5 µg/ml, Collaborative Res.), insulina (5 µg/ml, Collaborative Res.), ácido selénico (4 ng/ml, Fluka) y putrescina (8.8 µg/ml, Fluka). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 2-4 días.

2.- Cultivos de neuronas disociadas.

Los cultivos primarios de neuronas sensoriales se prepararon a partir de embriones de pollo de 9-11 días de incubación según el método descrito por Rogers (1983). Los ganglios se separaron como se describió en la sección precedente. Se colocaron en una solución salina de fosfato (PBS) desprovisto de calcio y de magnesio durante 15 min a una temperatura de 37°C. La disociación enzimática se realizó colocando los ganglios en una solución de tripsina (0.25%) en el mismo PBS a 37°C. Con el fin de detener el efecto de la enzima, los ganglios se lavaron con medio de cultivo que contenía 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco). La disociación mecánica se realizó con el paso sucesivo de los ganglios a través de una pipeta Pasteur siliconizada y con la punta redondeada. La

suspensión de células obtenida se colocó sobre la caja de cultivo con 2 ml de medio de cultivo 199 enriquecido con 5% de FBS.

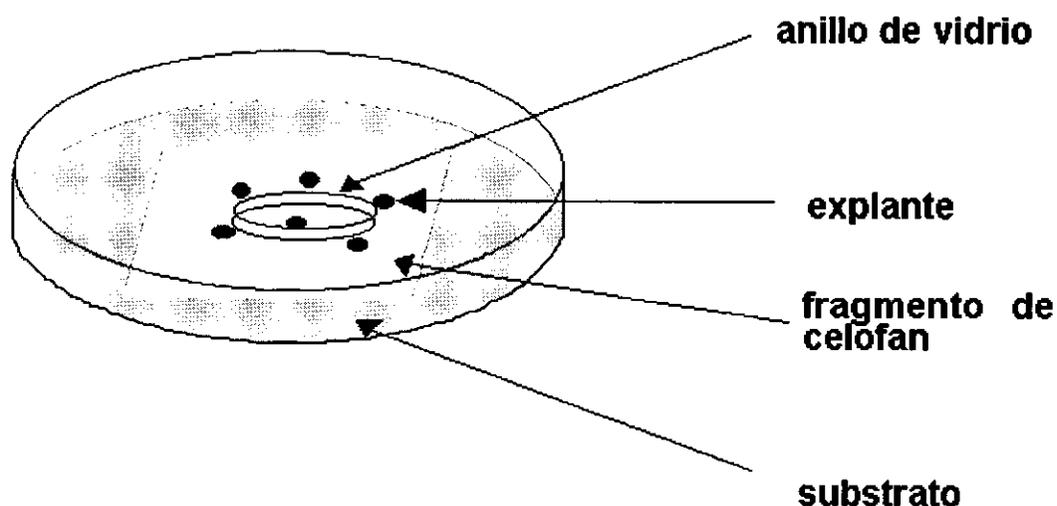


Figura 3 - Esquema de la disposición de la caja de cultivo con los explantes ganglionares durante las primeras 24 horas *in vitro*.

La concentración de células sembradas y la viabilidad de las mismas se midió con un hematocitómetro por el método de exclusión de azul de tripano (Sigma). La viabilidad celular mayor del 85% y una densidad de siembra de 100,000 células/ml fué utilizada para los estudios cuantitativos. Esta baja densidad celular facilita el estudio del crecimiento celular individual, evitando los contactos entre las células (Carbonetto y cols., 1983).

B). PREPARACIÓN DE SUBSTRATOS

El método de fijación de las lectinas sobre el plástico de las cajas de cultivo fué descrito por Hatten y François (1981). Este método consiste en recubrir el fondo de las cajas de cultivo con una solución acuosa de la proteína a probar y de carbodiimida [1-ciclohexyl-3-(2-morfolinoetil)-carbodiimida-metho-p-toluene su fonato] (Sigma). La adición de una sustancia como la carbodiimida facilita la adhesión de proteínas al plástico. Las lectinas utilizadas se indican en la Tabla IV.

**Tabla IV.- LECINAS UTILIZADAS COMO SUBSTRATOS DE CULTIVO EN EXPLANTES
GANGLIONARES Y NEURONAS DISOCIADAS**

LECTINA	NOMBRE COMÚN	NOMBRE TAXONÓMICO	ESPECIFICIDAD	AZUCAR INHIBITORIA UTILIZADA	PESO MOLECULAR (daltons)
Con A	Concanavalina A	<i>Concanavalina esniformis</i>	∞ -D-man, ∞ -D glc	∞ -methyl-D-mannopyranosida (0, 1 M)	110 000 a pH=7,2 (tetrámero) 55 000 a pH=4,2 (dímero)
PSA	Pea	<i>Pisum sativum</i>	∞ -D-man,	∞ -methyl-D-mannopyranosida (0, 1 M)	49 000 a pH=7,2
LCA	Lentil	<i>Lens culinaris</i>	∞ -D-man,	∞ -methyl-D-mannopyranosida (0, 1 M)	49 000 a pH=7,2 24 5000 a pH ácido
WGA	Wheat germ agglutinin	<i>Triticum vulgaris</i>	(D-glc NAc) ₂ , Neu NAc	N-acetyl-glucosamina (0, 3 M)	36 000 a pH=7,2 (dímero) 18 000 a pH=1,9 (monómero)
PWM	Pokeweed	<i>Phytolacca americana</i>	(D-glc-NAc) ₃	N-acetyl-glucosamina (0, 3 M)	30 000 a pH neutro
PNA	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-gal, D-gal NAc	β -methyl-D-galactosida (0, 4 M)	108 000 a pH neutro 72 000 a pH ácido
SBA	Soybean	<i>Glycine max</i>	D-gal NAc	N-acetyl-galactosamida (0, 2 M)	120 000 a pH neutro (tetrámero) 30 000 a pH ácido (monómero)
RCA 120	Castor bean	<i>Ricinus communis</i>	β -D-gal	β -methyl-D-galactisida (0, 2 M)	35 000 a pH neutro
UEA f	Gorze	<i>Ulex europeus I</i>	∞ -L-fuc	∞ -L-fucosa (0, 2 M)	46 000 a pH neutro

Tabla IV.- LECTINAS UTILIZADAS COMO SUBSTRATOS DE CULTIVO EN EXPLANTES GANGLIONARES Y NEURONAS DISOCIADAS

LECTINA	NOMBRE COMÚN	NOMBRE TAXONÓMICO	ESPECIFICIDAD	AZUCAR INHIBITORIA UTILIZADA	PESO MOLECULAR (daltons)
Con A	Concanavalia A	<i>Concanavalia esniformis</i>	∞ -D-man, ∞ -D glc	∞ -methyl-D-mannopyranosida (0, 1 M)	110 000 a pH=7,2 (tetrámero) 55 000 a pH=4,2 (dímero)
PSA	Pea	<i>Pisum sativum</i>	∞ -D-man,	∞ -methyl-D-mannopyranosida (0, 1 M)	49 000 a pH=7,2
LCA	Lentil	<i>Lens culinaris</i>	∞ -D-man,	∞ -methyl-D-mannopyranosida (0, 1 M)	49 000 a pH=7,2 24 5000 a pH ácido
WGA	Wheat germ agglutinin	<i>Triticum vulgaris</i>	(D-glc NAc) ₂ , Neu NAc	N-acetyl-glucosamina (0, 3 M)	36 000 a pH=7,2 (dímero) 18 000 a pH=1,9 (monómero)
PWM	Pokeweed	<i>Phytolacca americana</i>	(D-glc-NAc) ₃	N-acetyl-glucosamina (0, 3 M)	30 000 a pH neutro
PNA	Peanut	<i>Arachis hypogaea</i>	β -D-gal, D-gal NAc	β -methyl-D-galactosida (0, 4 M)	108 000 a pH neutro 72 000 a pH ácido
SBA	Soybean	<i>Glycine max</i>	D-gal NAc	N-acetyl-galactosamida (0, 2 M)	120 000 a pH neutro (tetrámero) 30 000 a pH ácido (monómero)
RCA 120	Castor bean	<i>Ricinus communis</i>	β -D-gal	β -methyl-D-galactisida (0, 2 M)	35 000 a pH neutro
UEA f	Gorze	<i>Ulex europeus l</i>	∞ -L-fuc	∞ -L-fucosa (0, 2 M)	46 000 a pH neutro

1). Substratos de lectinas.

200 μ l de solución acuosa de lectina (50 y 100 μ g/ml) y de carbodiimida (5 mg/ml) se colocaron en las cajas de Petri durante 2 horas a 37°C. Después de este periodo, las cajas fueron lavadas tres veces con agua destilada, secadas y esterilizadas por la exposición a radiación ultravioleta durante 30 minutos a temperatura ambiente.

2). Substratos control.

Para cada grupo experimental, cuatro cultivos controles fueron realizados:

a).- cultivo sin ningún sustrato (plástico).

b).- cultivo sobre sustrato de carbodiimida (5 mg/ml).

c).- cultivo sobre sustrato de poli-L-lisina (10 μ g/ml, Sigma) y carbodiimida (5 mg/ml) y finalmente

d).- cultivo sobre sustrato de poli-L-lisina (10 μ g/ml) al cual se agregó carbodiimida en solución al medio de cultivo alcanzando una concentración final de 5 mg/ml.

C). DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE LECTINA UNIDA Y LIBERADA DE LA CAJA DE CULTIVO.

Las cantidades de lectinas adheridas a la caja de cultivo, así como aquellas liberadas en el medio de cultivo durante el tiempo de incubación de las células, fueron evaluadas por un método de marcaje radioactivo de proteínas (iodo 125 I).

1.- Identificación de lectinas.

El método de marcaje de proteínas con 125 I fué descrito por Fraker y Speck (1973). En breve, este método consiste en poner en contacto 10 μ l de una solución acuosa de la proteína a estudiar (5 mg/ml) con 10 μ l de una solución de iodogen (Sigma) en cloroformo (1 mg/25 ml).

La solución resultante se incubó con 1 mCi de 125 I durante 15 minutos en agitación constante. La solución se pasa después en una columna de gel P6-D6 (nivel de exclusión 5000) con elución de cloroformo. La actividad específica del marcado obtenido (cpm/mg de proteína) se midió con la ayuda de un contador de centelleo gamma (Packard).

2.- Cantidades de lectinas unidas a la caja de cultivo.

El método de fijación de lectinas a las cajas de cultivo fué el mismo descrito con anterioridad, con la única diferencia que las lectinas utilizadas estaban previamente marcadas con 125 I.

Después del triple lavado con agua destilada, los fondos de 5 cajas de cultivo se cortaron y se les midió su radioactividad en el contador de centelleo. El valor medio

obtenido en cpm (cuentas por minuto) se utilizó para calcular la cantidad de lectina unida por unidad de superficie (ng/mm^2).

3.- Cantidad de lectina liberada en el medio de cultivo.

Después de fijar las lectinas marcadas con ^{125}I a las cajas de cultivo, 2 ml del mismo medio de cultivo utilizado en los estudios *in vitro* fué agregado a cada caja de cultivo y se introdujeron a la incubadora (37°C) durante 24 horas.

Cada 3 horas, $10\ \mu\text{l}$ del medio de cultivo fué tomado de cada caja Petri. Los valores promedio (cpm) obtenidos fueron utilizados para calcular la curva de liberación durante las primeras 24 horas de cultivo (ver Figura 5 en Resultados).

El porcentaje de liberación se calculó como la relación entre la cantidad promedio de lectina liberada (en cpm) al medio de cultivo y la cantidad promedio (en cpm) unida a la caja de cultivo.

D).- TRATAMIENTO CON SOLUCIONES DE LECTINAS.

El efecto de las lectinas agregadas en solución al medio de cultivo fué analizada tanto en cultivos de explantes ganglionares como de cultivos de neuronas disociadas.

Las concentraciones utilizadas se encuentran reportadas en la Tabla V. Para el cultivo de explantes estas fueron agregadas después de 24 horas *in vitro*. En el caso de neuronas disociadas, la adición de lectinas se realizó con 2 modalidades: desde el inicio del cultivo o después de 4 horas *in vitro* (es decir una vez que las neuronas se encuentran adheridas al substrato de cultivo). El efecto de las lectinas en solución en ambas condiciones fué analizado después de 24 horas de cultivo.

Tabla V. CONCENTRACIONES DE SOLUCIONES DE LECTINAS UTILIZADAS EN CULTIVOS DE EXPLANTES GANGLIONARES (E.G.) Y EN NEURONAS DISOCIADAS (N.D.)

Lectina	0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Con A	N.D.	N.D.	E.G. y N.D.	E.G. y N.D.
WGA	N.D.	---	E.G. y N.D.	E.G. y N.D.
PNA	N.D.	---	E.G. y N.D.	E.G. y N.D.
UeAf	N.D.	---	E.G. y N.D.	E.G. y N.D.

E).- APLICACIÓN DE AZÚCARES ESPECÍFICAS.

Para estudiar la especificidad de cada lectina utilizada en el presente trabajo se utilizaron tanto cultivos de explantes ganglionares como de células disociadas.

Las concentraciones de azúcares específicas agregadas al medio de cultivo se encuentran reportadas en la Tabla IV y corresponden a las concentraciones de saturación de los sitios activos para cada lectina. Para los explantes ganglionares, el azúcar correspondiente se agregó 24 horas después de iniciado el cultivo. En el caso de los cultivos de neuronas disociadas estas azúcares fueron agregadas después de que las neuronas estaban adheridas al sustrato (es decir 4 horas *in vitro*). El efecto de esta maniobra experimental se analizó después de 24 horas de la adición del glúcido al cultivo.

F).- EFECTO DE GLUCOSIDASAS.

Únicamente fué analizado el efecto de la α -manosidasa sobre el crecimiento neuronal de los cultivos de explantes ganglionares.

Los experimentos realizados consistieron en un pre-cultivo del explante ganglionar durante 24 horas sobre un sustrato de Con A (50 μ g/ml) + carbodiimida (5 mg/ml). Después de este periodo, la glucosidasa se agregó en el medio de cultivo a una concentración de 0.4 U/ml y el comportamiento celular se analizó por microcinematografía.

1.- Técnica de microcinematografía imagen por imagen.

Los cultivos fueron analizados colocando las cajas de cultivo sobre la platina de un microscopio invertido con contraste de fase y luz interferencial (Leitz Diavert) el cual contaba con un dispositivo de control de temperatura y de obscuridad. Las tomas fotográficas se realizaron automáticamente cada 15 minutos a partir del segundo día de cultivo durante 2-4 horas después de agregar la enzima.

Las secuencias microcinematográficas se realizaron con una cámara fotográfica automática (Mamiya 2E-X) dirigida por un disparador programable, el cual iluminaba también la imagen cada 15 minutos.

G).- INMUNOCITOQUÍMICA CON LECTINAS FLUORESCENTES

Las lectinas utilizadas (Sigma) fueron las siguientes:

- Concanavalina A marcada con fluoresceína (Con A-FITC)
- Aglutinina de trigo marcada con rodamina (WGA-TRITC).

1.- Marcado celular.

Cada lectina se disolvió en una solución de PBS (pH = 7.2) a una concentración de 100 µg/ml. El método utilizado de inmunomarcado fue descrito por Sieber-Blum y Cohen (1978).

Después de 24-48 horas de cultivo, las cajas fueron lavadas 3 veces con PBS. Los cultivos se fijaron con 2 ml de paraformaldehído al 1% en PBS, durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Los cultivos fueron lavados 3 veces con PBS y recubiertos con 40 µl de la lectina marcada (100 µg/ml) durante 20 min a 4°C y bajo oscuridad. Los cultivos se lavaron nuevamente 3 veces con PBS. Después de retirar todo el PBS se recubrieron con una gota de alcohol polivinílico (PVA) y se recubrieron con un cubreobjetos de vidrio (16 x 16 mm) el cual fue sellado con barniz de uñas incoloro. Las cajas se guardaron a 4°C en la oscuridad antes de hacer las observaciones correspondientes.

2.- Inhibición competitiva del marcado.

Para cada lectina fluorescente utilizada, se realizó su control de inhibición específica. Para lo cual algunas cajas de cultivo después de haberlas fijado y lavado como se indicó en la sección precedente, se recubrieron con 40 µl de una solución (v/v) de lectina (100 µg/ml) y su monosacárido específico a la concentración de saturación (Tabla IV). Las siguientes etapas se realizaron como se mencionó con anterioridad.

3.- Observación de los cultivos.

Las células marcadas se observaron bajo el microscopio fluorescente Leitz Ortholux II. Las tomas fotográficas se realizaron con una película Kodak Tri X pan (400 ASA).

H). DOBLE INMUNOCITOQUÍMICA: LECTINAS-CITOESQUELETO

La distribución intracelular de microfilamentos y microtúbulos se analizó en paralelo con la distribución de lectinas en la superficie celular.

Diversos métodos fueron probados con el fin de obtener una preparación que permitiera la observación de los filamentos de actina sin modificar los componentes de la superficie celular. El método escogido se adaptó del aquel descrito por Letourneau y Sattuck (1989).

Los cultivos se fijaron y marcaron con la lectina fluorescente como se describió en la sección G. Los cultivos marcados con Con A-FITC fueron tratados con faloiidina conjugada con rodamina (Sigma) para la observación de la actina y los marcados con WGA-TRITC, se utilizaron para observar los microtúbulos.

1.- Determinación de actina por medio de faloiidina

Después del último lavado con PBS, los cultivos marcados con Con A-fluoresceina, fueron incubados durante 10 minutos con una solución de borohidrato de sodio (1 mg/ml en PBS libre de calcio y magnesio). Se lavaron después con una solución de albúmina de bovino 5 mg/ml en PBS, el cual contenía 0.1% de tritón X-100, durante 15 minutos. Después de esta permeabilización, los cultivos fueron incubados con phaloiidina disuelta en PBS a una concentración de 3×10^{-7} M, durante 30 minutos en la oscuridad. Finalmente, se lavaron con PBS y se montaron con PVA.

2.- Detección de microtúbulos por inmunomarcaje indirecto.

Los cultivos procesados para este estudio, se sometieron a los mismos pasos de lavados y permeabilización como los descritos en el párrafo anterior. La incubación con un primer anticuerpo monoclonal anti- β -tubulina (Amersham) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, diluido 1/200 en PBS. Los cultivos se lavaron y volvieron a permeabilizar para entonces agregar el segundo anticuerpo marcado con fluoresceina, durante 60 minutos a una dilución de 1/100. Por último, los cultivos se lavaron con PBS y se montaron con PVA.

I). ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA FORMA NEURONAL.

El método de análisis utilizado para cuantificar la morfología neuronal se realizó únicamente sobre cultivos de células disociadas. Sólo se tomaron en cuenta aquellas neuronas que se encontraban bien individualizadas y que no estaban en contacto con otros procesos neuríticos. Este análisis morfométrico consistió en medir diversos parámetros morfométricos sobre diapositivas de los cultivos.

1.- Método de toma de diapositivas.

Después de 24 horas de cultivo, las células eran fijadas con una solución de glutaldehido al 2.5% en PBS durante 20 minutos a 4°C. Las tomas fotográficas se tomaron bajo el microscopio invertido con contraste de fase (Leitz Diavert). Veinte neuronas aisladas eran fotografiadas al azar en cada caja de cultivo de cultivos diferentes para cada serie experimental.

2.- Los parámetros estudiados.

El desarrollo neuronal se cuantificó midiendo siete parámetros morfométricos, con la ayuda de un sistema informatizado, el cual estaba compuesto de una computadora (Apple III, 256 K de memoria), de una impresora (Apple) y de una tableta digitalizadora (Hi-Pad, Houston Instruments, Brusck y Lomb).

El método consiste en proyectar las diapositivas (aumento final 600 x) sobre la tableta a digitalizar. Esto se realizó proyectando la imagen sobre un espejo orientado a 45° con respecto a la tableta. Con la ayuda de un lápiz electrónico se dibujaron los diversos contornos a digitalizar. Los valores de los parámetros son calculados y almacenados en la computadora.

El programa de obtención de datos y de análisis de los mismos que se utilizó fue desarrollado en el propio laboratorio por el Dr. Yves Usson.

Dos tipos de parámetros fueron estudiados, aquellos que se refieren a los procesos neuríticos y aquellos concernientes a la forma de la célula.

Parámetros neuríticos:

Número total de neuritas (Nn). Este parámetro consiste en medir el número total de neuritas primarias que se originan a partir del soma celular.

Número de bifurcaciones de las neuritas (Nb). Este parámetro representa el número total de bifurcaciones de las neuritas primarias y de sus ramificaciones.

Longitud total de las neuritas (Ln, en μm). Este parámetro representa la suma de las longitudes de las diversas neuritas con todo y sus ramificaciones.

Parámetros de la forma:

La ocupación espacial (O.E.) corresponde a la geometría del área ocupada por toda la neurona. Se determinó con una rejilla en donde se toman en cuenta todos los cuadros que contienen al menos alguna parte de la célula (Figura 4 A). Estudios preliminares nos permitieron escoger el tamaño de la rejilla que mejor se adaptaba a nuestras muestras, resultando ser una rejilla de 30 mm de lado que corresponde a un valor real de 25 μm . Con este método se calcularon tres parámetros:

Área de ocupación espacial (AOE, en μm^2). Este parámetro corresponde al área total de los cuadros que contienen a la neurona.

Perímetro de ocupación espacial (POE, en μm). El cual corresponde al perímetro total de la figura geométrica formada por los cuadros que contienen a la neurona.

Factor de forma (FF). Este parámetro indica la geometría de la neurona al comparar el área y el perímetro. Se obtiene con la siguiente fórmula:

$$FF = \frac{4\pi \times \text{AOE}}{(\text{POE})^2} \times 1000$$

El último parámetro de la forma neural fué el denominado forma global (FG) y se determina calculando el menor paralelepipedo que engloba a toda la neurona. El valor de este parámetro se obtiene con la relación base/altura de dicha figura geométrica (Figura 4 B).

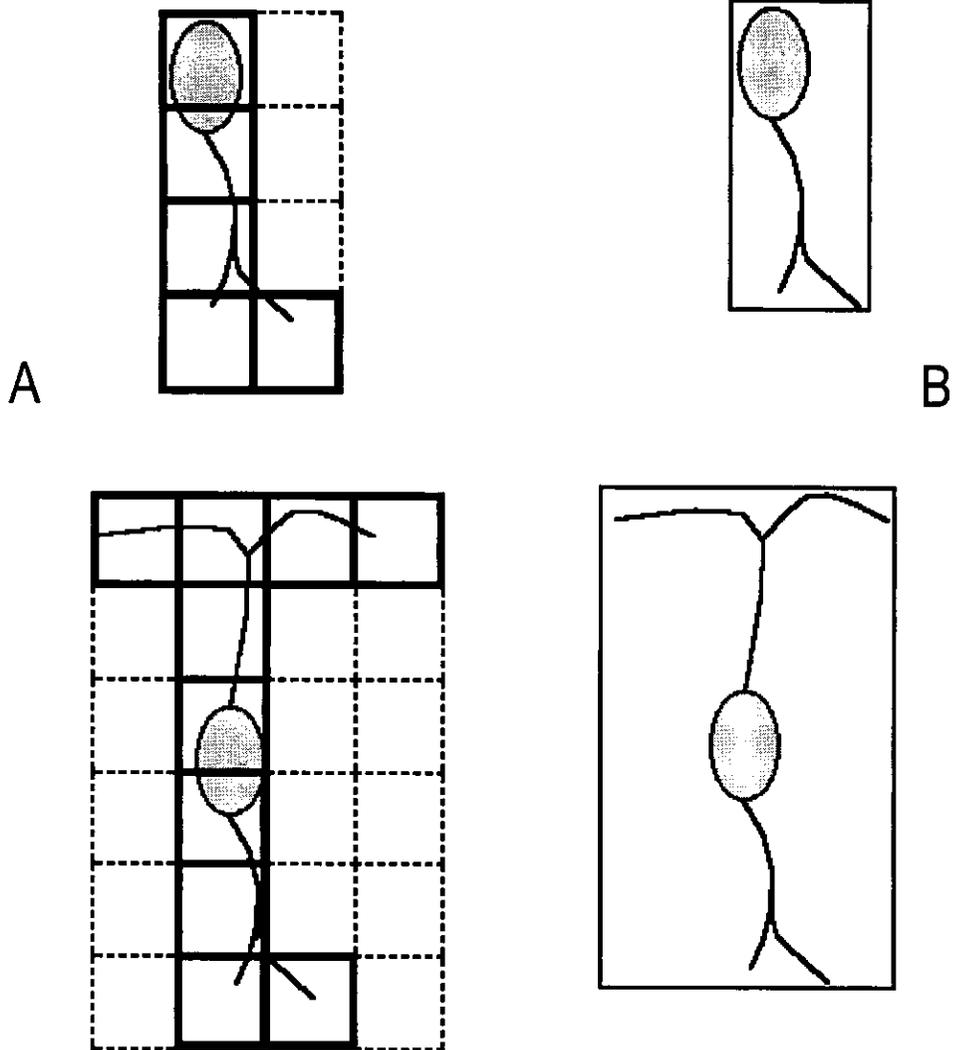


Figura 4 - Esquemas de dos neuronas proyectadas para medir el área de ocupación espacial (A) y la forma global (B). Los cuadros con líneas oscuras de la parte A representan aquellos que son tomados en cuenta para el cálculo del área, las líneas punteadas representan la rejilla. En la parte B se calcula el área total como el producto de la base por la altura del rectángulo marcado.

J). ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis cuantitativo de la forma neuronal se realizó con base en métodos estadísticos:

1.- Comparación de medias y varianzas.

La comparación de medias se realizó determinando previamente la distribución de la variable a estudiar. Generalmente, la forma de los histogramas de distribución de la población permite realizar esta determinación. En este estudio se separaron las distribuciones poblacionales en dos tipos: la distribución de tipo normal (o de Gauss) y la de tipo Poisson.

En el caso de que la variable a estudiar presentara una distribución de tipo normal, la comparación de media se realizó por la prueba de Student (prueba de t) y la de sus varianzas por la prueba de Fischer (prueba F). Si la variable estudiada presentaba una distribución de tipo Poisson, entonces sólo se realizó la comparación de varianzas por la prueba de Fischer (Schwartz, 1981).

Estas pruebas se realizaron con un rango de error inferior o igual al 5%.

2.- Análisis multifactorial.

Los análisis multifactoriales utilizados permitieron por un lado comparar los diversos substratos utilizados para un determinado parámetro medido (análisis factorial de correspondencias o AFC) y por otro lado, el estudio simultáneo de diversos parámetros para el conjunto de substratos (análisis de componentes principales o ACP).

3.- Análisis Factorial de Correspondencias (AFC).

Este análisis es una representación gráfica simultánea de la distribución de diversos caracteres de una población. Toma en cuenta los valores relativos de los caracteres y une el máximo de información en un pequeño número de gráficas, en donde cada población es considerada como un todo (Lagarde, 1981).

En este trabajo se analizaron las correspondencias existentes entre cada grupo experimental y las diferentes clases de distribución obtenidas para cada uno de los parámetros. La mayor parte de la información se acumula en los 2 primeros planos factoriales y el peso de los grupos y de los caracteres esta simbolizado por un rectángulo cuya área corresponde a la proporción de peso de la muestra (ver un ejemplo en la Figura 14 de Resultados). El peso de la muestra en nuestro experimento corresponde al número de células.

4.- Análisis de Componentes Principales (ACP).

Este análisis es una representación multidimensional que muestra las tendencias de las poblaciones con respecto a los diversos parámetros estudiados. Considera aisladamente a cada individuo de la población con todos sus parámetros y lo grafica

como una nube de puntos distribuidos en el espacio de diversas dimensiones (Lagarde, 1981).

En el presente estudio las gráficas representan la proyección de estos puntos en uno de los espacios factoriales y las poblaciones de neuronas están representadas por su centro de gravedad y su elipse de confianza al 68%. En la misma gráfica, los parámetros se representan como vectores que parten del origen (ver un ejemplo en la Figura 20 de Resultados).

5.- Análisis Discriminante (AD) paso a paso.

Este análisis es complementario del ACP. Consiste en limitar al mínimo indispensable el número de variables discriminantes a medir a fin de poder con una mayor confiabilidad conocer a que población pertenece un individuo dado. Así, el ACP permite describir las categorías mientras que el AD las distingue. El AD se realiza seleccionando una a una las variables, comenzando por aquellas donde su poder discriminante es el mayor y deteniéndose en aquel cuya influencia ya no sea significativa.

RESULTADOS

La primera parte del presente trabajo se dedicó al análisis del efecto sobre el crecimiento neuronal de las lectinas utilizadas como sustrato de cultivo.

1). ADHESIÓN Y LIBERACIÓN DE LECTINAS DE LAS CAJAS DE CULTIVO.

Para tener un control de la cantidad real de lectina unida a las cajas de cultivo y la que se libera a lo largo del cultivo se realizó el marcaje de la lectina Ccn A con iodo 125 I. Esta manipulación experimental se realizó en el laboratorio de Fisiología Animal de la Universidad Joseph Fourier con la asesoría de Profesor M. Block.

En la figura 5 se muestra la curva de liberación de lectina al medio de cultivo obtenida durante las 24 horas de cultivo. Estos valores corresponden a los porcentajes de lectina liberada que fueron obtenidos con respecto al promedio de radioactividad que se adhiere al fondo de la caja (para 5 cajas de cultivo = $7.1 + 1.0 \times 10^6$ cpm/caja). Este valor corresponde a $3.2 \mu\text{g}$ de lectina que se queda unida al fondo de la caja de 35 mm cuando se agregan $200 \mu\text{l}$ de la solución de lectina y carbodiimida ($50 \mu\text{g/ml}$ y 5 mg/ml , respectivamente).

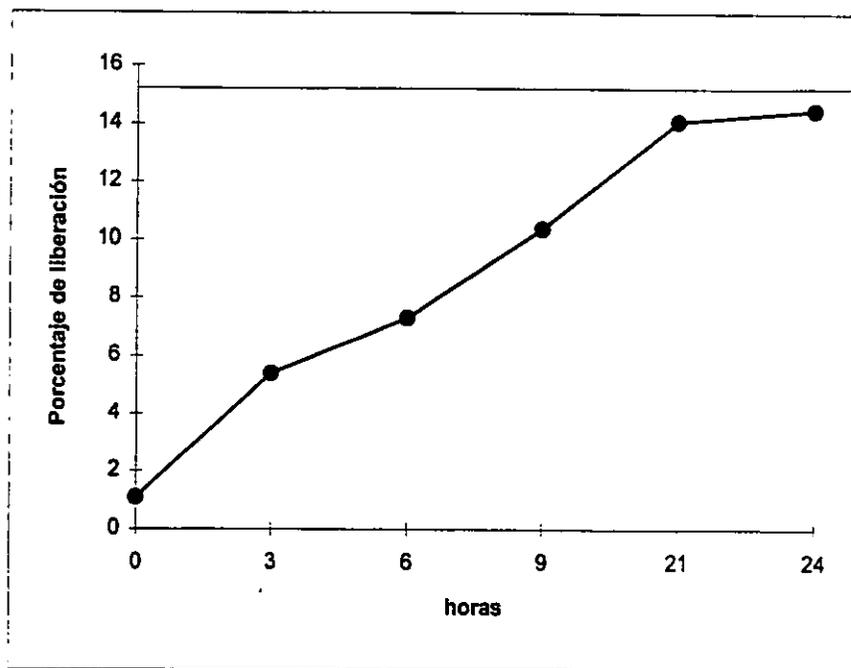


Figura 5 - Porcentaje de 125 I-Con A liberada al medio de cultivo a lo largo de las 24 horas de cultivo. Los valores son el promedio de 5 cajas de cultivo.

En la curva de liberación de lectina que se muestra en la figura 5 se puede observar que el porcentaje de lectina liberada alcanza un valor estable a partir de la hora 21 *in vitro*. El porcentaje de lectina liberada al medio de cultivo durante las primeras 24 horas corresponde al 15% de la cantidad total de la lectina adherida; correspondiendo esto a una concentración de 0.25 µg/ml aproximadamente.

Los principales resultados obtenidos en esta sección son:

- la cantidad de lectina liberada se estabiliza a partir de la hora 21 de cultivo.
- el porcentaje de lectina liberada al medio de cultivo a lo largo de las primeras 24 horas representa aproximadamente 15% de la cantidad total de la lectina unida al fondo de la caja.
- la concentración de lectina liberada al medio de cultivo, después de 24 horas de cultivo equivale aproximadamente a 0.25 µg/ml.
- los porcentajes (14-15%) de liberación obtenidos son aproximadamente el doble de los reportados por otros autores.

La cantidad de lectina que se libera en el medio de cultivo, fué probada agregándola a cultivos realizados sobre un sustrato de polilisina, con el fin de distinguir el "efecto sustrato" del "efecto en solución" de las lectinas (ver resultados más adelante).

II). CULTIVOS SOBRE SUBSTRATOS DE LECTINAS.

Los resultados que se presentan en esta sección se agruparon en dos grandes partes: la primera se refiere a la descripción de la forma y el crecimiento global de las neuronas y la segunda dedicada al análisis cuantitativo de la morfología neuronal. En la primera parte se presentan los resultados obtenidos de cultivos de explantes ganglionares y de células disociadas, en cambio para el análisis cuantitativo se utilizaron sólo cultivo de células disociadas.

A) EFECTO DE LOS SUBSTRATOS DE LECTINAS SOBRE LA FORMA Y EL CRECIMIENTO GLOBAL DE LAS NEURONAS SENSORIALES.

Los cultivos de explantes ganglionares se realizaron sobre los diversos sustratos control y sobre nueve lectinas diferentes. Los resultados obtenidos después de 48 horas *in vitro* se describen a continuación y corresponden a las fotografías # 6 y 7.

1. Cultivos control.

Polilisina + carbodiimida (Figura 6, A1 y A2). Las fibras nerviosas que se forman sobre este sustrato son alargadas y crecen en forma aislada. Se observan pocas células gliales, las cuales permanecen generalmente en las cercanías del explante ganglionar.

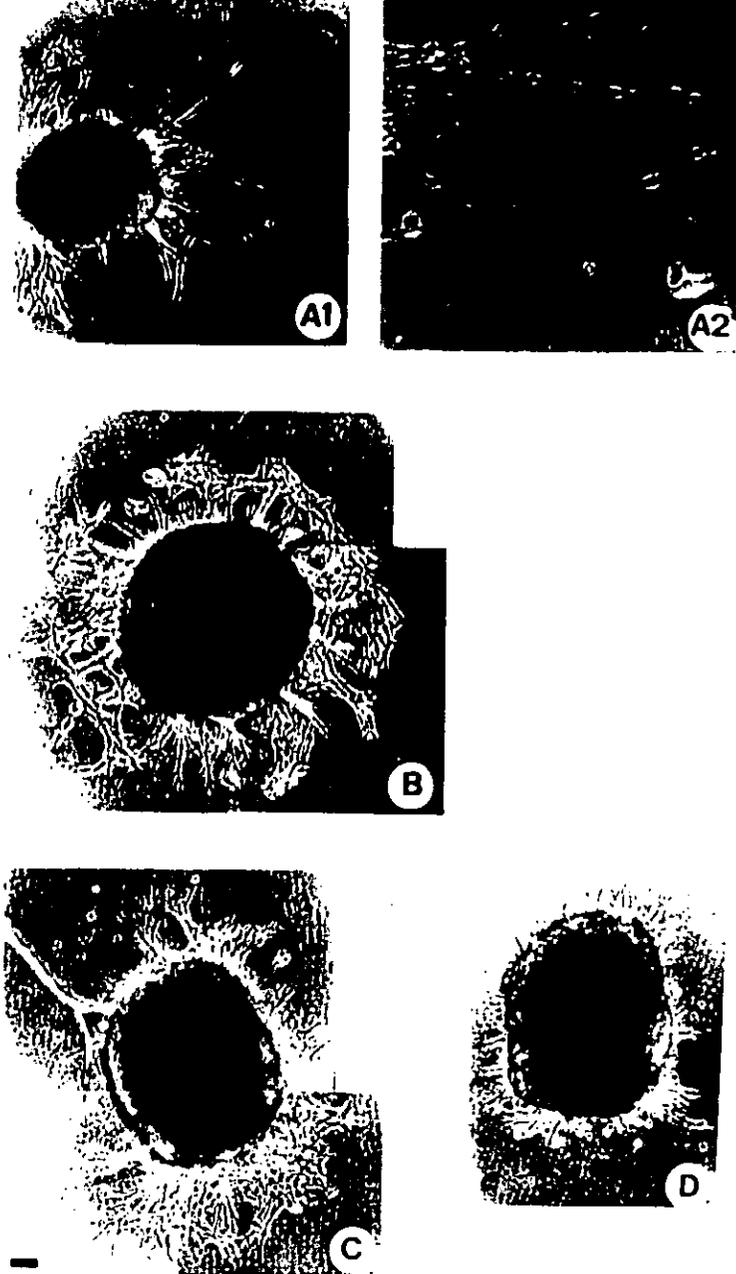


Figura 6 - Microfotografías de explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados durante 48 horas sobre diversos sustratos y medios.

- A1 - Explante cultivado sobre un sustrato de polilisina + carbodiimida con medio de cultivo normal.
- A2 - Fibras nerviosas creciendo sobre las mismas condiciones que en A1. En esta fotografía pueden observarse el crecimiento de fibras aisladas sin ramificaciones y sin células gliales.
- B - Explante cultivado sobre un sustrato de polilisina con medio de cultivo al que se agregó 5 mg/ml de carbodiimida. El crecimiento de fibras nerviosas es escaso, gran proliferación de células no neuronales migrando fuera del explante. A pesar del poco crecimiento nervioso no parece haber un efecto tóxico de estas condiciones de cultivo para los explantes ganglionares.
- C - Explante cultivado sobre un sustrato de carbodiimida con medio de cultivo normal. El crecimiento de fibras nerviosas y de células gliales es poco favorecido por este sustrato.
- D - Explante cultivado directamente sobre el plástico con medio de cultivo normal. El crecimiento de células nerviosas y gliales es casi nulo a lo largo de las 48 horas *in vitro*, por lo cual el plástico de la caja es un sustrato poco favorable para el crecimiento de estos tipos celulares.

La línea negra marcada sobre la microfotografía C representa 50 μm que es la escala correspondiente para las fotografías A1, B, C y D, para la fotografía A2 corresponde a 10 μm .

Polilisina más carbodiimida en solución (Figura 6, B). El crecimiento de fibras nerviosas es restringido, siendo éstas de pequeña longitud y formando entre ellas una red compacta con algunos grupos de fibras y células no neurales.

Carbodiimida (Figura 6, C). Los procesos formados sobre este sustrato son cortos y se encuentran formando una red de células gliales y fibras nerviosas. Raramente se observan fibras nerviosas aisladas, las cuales permanecen en la cercanía del explante ganglionar.

Plástico (Figura 6, D). El crecimiento neurítico sobre el plástico de la caja de cultivo es casi nulo al igual que el desarrollo de células gliales.

Los resultados obtenidos en los 4 sustratos control muestran que cuando se agrega carbodiimida en solución al medio de cultivo a la misma concentración utilizada para la adhesión de las proteínas, no ejerce un efecto tóxico sobre el crecimiento de neuritas. Sin embargo, la misma carbodiimida cuando es utilizada como único sustrato de cultivo es un soporte poco adecuado para el desarrollo de los explantes nerviosos al igual que lo es el cultivo sobre el plástico de cultivo. De estos resultados observamos que el mejor sustrato de cultivo entre los cuatro utilizados, es el formado por polilisina más carbodiimida.

2. Cultivos sobre lectinas.

a). **Lectinas con especificidad a manosa y glucosa.** Tres lectinas fueron probadas: la Con A, la PSA y la LCA, a dos concentraciones diferentes (50 y 100 µg/ml). Los resultados obtenidos fueron muy similares para ambas concentraciones y se describen a continuación:

Con A (Figura 7, A1 y A2). La red de fibras nerviosas que se forma sobre este sustrato es muy densa, con numerosas interconexiones. Las fibras nerviosas tienden a presentar un crecimiento de tipo aislado más que agrupado en conjuntos nerviosos (A2). Las células gliales permanecen en la periferia cercana del explante ganglionar.

PSA (Figura 7, B1 y B2). Las neuritas formadas sobre esta lectina son numerosas y con crecimiento aislado. Raramente se forman conjuntos de fibras nerviosas y cuando se forman son de pequeño diámetro. Los conos de crecimiento son muy grandes y extendidos, pero con pocos filopodios (B2). Raramente se observan otros tipos celulares.

LCA (Figura 7, C1 y C2). Numerosas fibras nerviosas se desarrollan sobre este sustrato formando una red de fibras. Los conos de crecimiento son grandes y a algunos presentan filopodios (C2). No se observan células gliales.

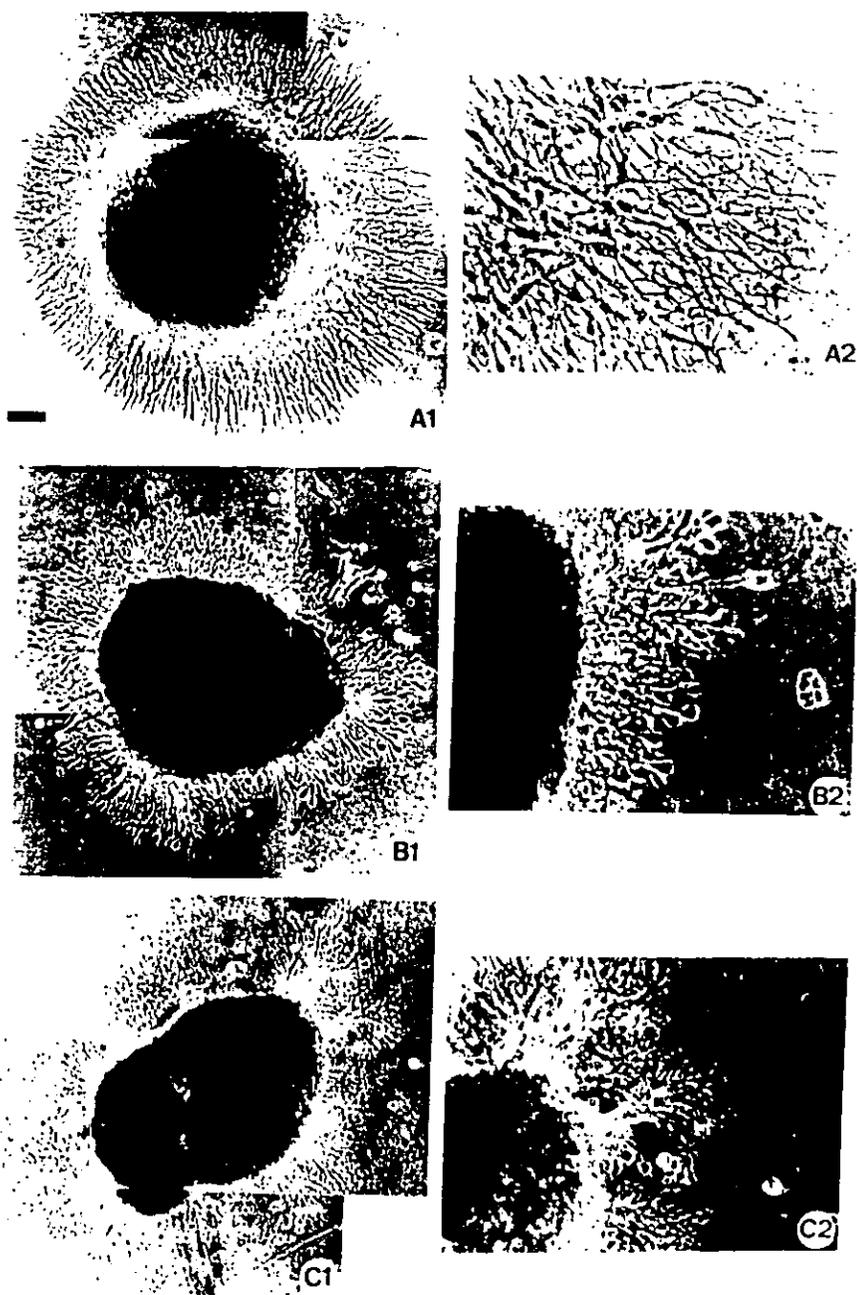


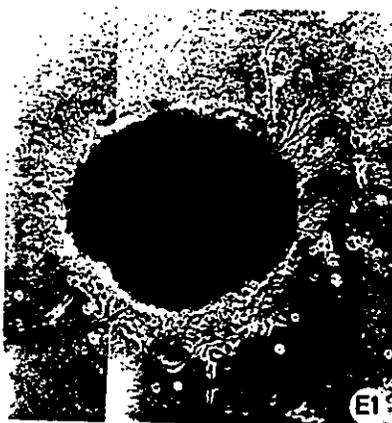
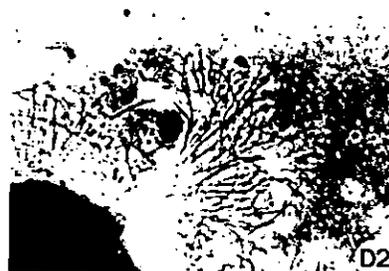
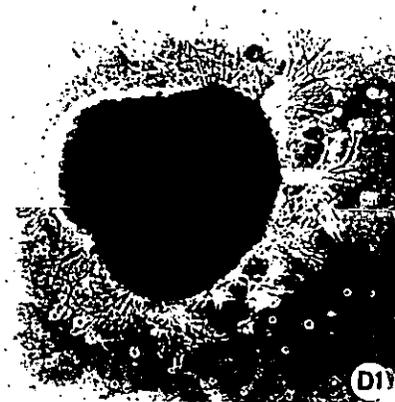
Figura 7 - Microfotografías de explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados durante 48 horas sobre diversos sustratos experimentales.

A - Substrato de Con A + carbodiimida. Explante ganglional (A1) con un notable y simétrico crecimiento de fibras nerviosas. Las fibras nerviosas (A2) con interconexiones y prominentes ramificaciones, ausencia de células gliales en la parte distal, las cuales permanecen en las cercanías del explante.

B - Substrato de PSA + carbodiimida. El crecimiento de fibras nerviosas (B1) es menor comparado con el sustrato anterior, con tendencia a ramificarse y un cono de crecimiento muy prominente (B2). Pocas células gliales.

C - Substrato de LCA + carbodiimida. El crecimiento nervioso alrededor del explante no es uniforme (C1), con tendencia a un crecimiento en conjuntos de fibras, las cuáles se separan más adelante (C2). Cuando las fibras nerviosas crecen aisladamente presentan ramificaciones y conos de crecimiento aplanados. Casi no se observan células gliales.

La línea negra marcada sobre la microfotografía A1 representa 50 μm que es la escala correspondiente para las fotografías A1, B1, C1, D1, E1, F1, G1, H1 e I, para las fotografías con sub índice 2 corresponde a 10 μm .



Continuación figura 7.

D - Substrato de PNA + carbodiimida. Crecimiento asimétrico de fibras nerviosas alrededor del explante (D1). En algunas ocasiones las fibras inician su crecimiento agrupadas y en otras en forma aislada (D2). Algunas fibras nerviosas forman interconexiones y ramificaciones. Los conos de crecimiento son variables: los aplanados presentan filopodios que no se observan en aquéllos poco prominentes. El crecimiento de fibras gliales también es escaso.

E - Substrato de SBA + carbodiimida. Escaso crecimiento neurítico y glial sobre este substrato (E1). Las escasas fibras son delgadas y con conos de crecimiento poco prominentes (E2).

F - Substrato de RCA100 + carbodiimida. Crecimiento de fibras nerviosas y células no nerviosas nulo (F1). Al observar las fibras nerviosas éstas son delgadas, rectas y escasísimas (F2), no se observan células gliales.

En resumen, podemos decir que las lectinas con especificidad a manosa y glucosa son sustratos de cultivo que favorecen el crecimiento neuronal e inhiben el desarrollo de células gliales. Al comparar el crecimiento de las fibras nerviosas sobre estos sustratos con el grupo control (polilisina + carbodiimida) se observa una tendencia a un mayor crecimiento neurítico, con más ramificaciones y pocas células gliales.

b). Lectinas con especificidad a galactosa y galactosamina.

PNA (Figura 7, D1 y D2). Las fibras nerviosas formadas sobre este sustrato son pequeñas y forman una red espesa alrededor del explante. Raramente se observan fibras nerviosas aisladas, más bien se agrupan en pequeños nervios. Los conos de crecimiento son alargados y con diversos filopodios (D2). Pocas células gliales se observan sobre esta lectina.

SBA (Figura 7, E1 y E2). El crecimiento de fibras nerviosas en este sustrato es reducido. Las fibras nerviosas presentan corta longitud y se agrupan formando redes (E2). Al observar a los otros tipos celulares se muestra que algunas células gliales se desplazan más allá del explante ganglional.

RCA₁₀₀ (Figura 7, F1 y F2). Las neuritas formadas son escasas y muy delgadas aún hasta el nivel del cono de crecimiento (F2). Las células gliales también están poco desarrolladas.

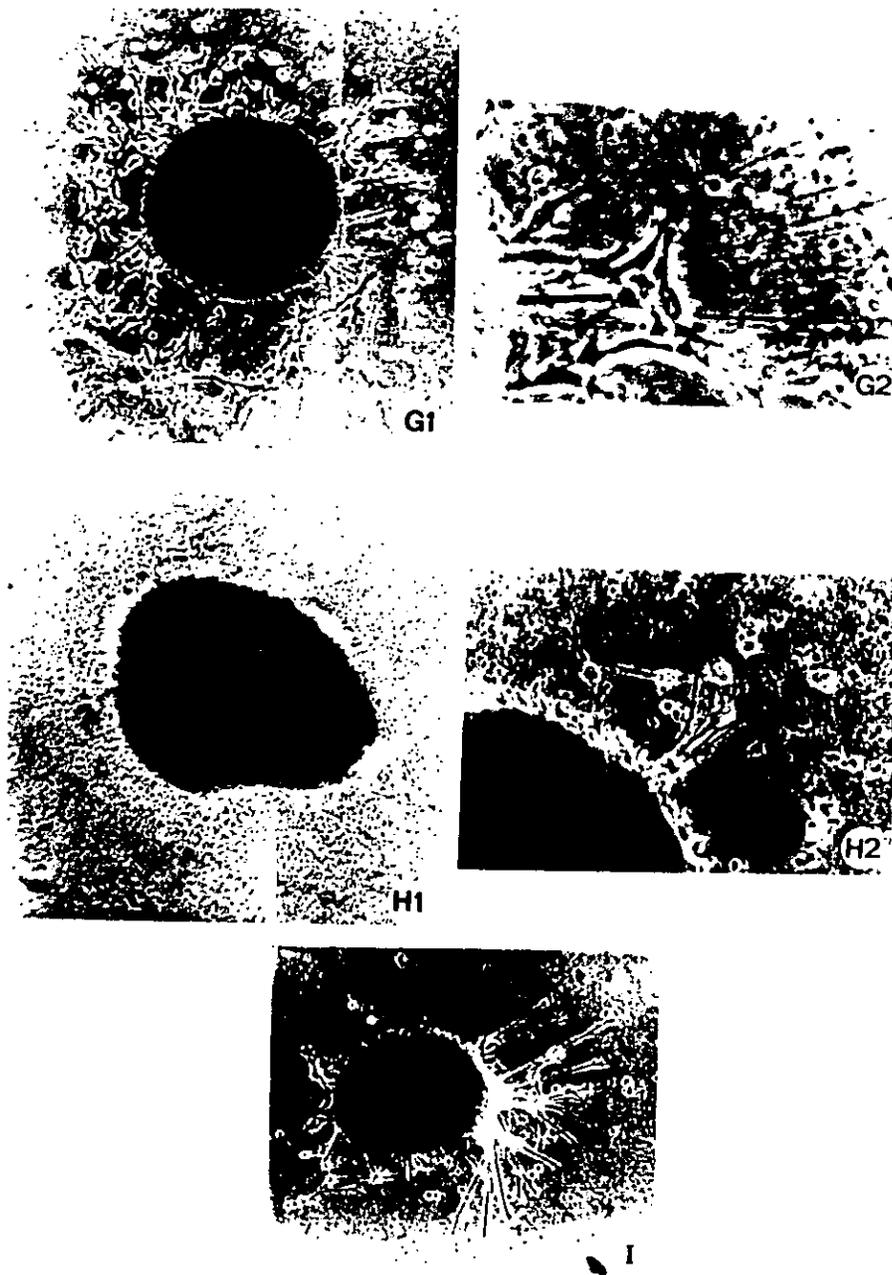
Estos resultados muestran que el sustrato formado por la lectina RCA₁₀₀ cuya especificidad monosacárida es galactosa es un sustrato poco adecuado para el crecimiento neurítico de explantes de neuronas sensoriales de la cadena dorsal de embrión de pollo. Por otro lado, los sustratos formados por SBA, con especificidad a galactosamina y por PNA, con reconocimiento a galactosa y galactosamina son lectinas que aunque permiten el desarrollo de fibras nerviosas y la formación de redes nerviosas, este crecimiento es aún poco favorable comparado con el observado en otros sustratos de lectinas y con el grupo control.

c). Lectinas con especificidad a glucosamina y ácido neuramínico.

WGA (Figura 7, G1 y G2). Casi ninguna fibra nerviosa se desarrolla sobre esta lectina. Cuando alguna de ellas se logra observar, presenta las características de ser muy delgadas y crecer siempre en contacto con las células gliales, las cuales por su lado se desarrollan bien sobre este sustrato (flecha G2).

PMW (Figura 7, H1 y H2). Sobre este sustrato casi no existe nada de crecimiento neurítico, así como tampoco de células gliales.

Estos resultados muestran que los sustratos formados por lectinas con reconocimiento a galactosamina y ácido neuramínico son soportes que inhiben el crecimiento neurítico de explantes ganglionares sensoriales de embrión de pollo.



Continuación figura 7.

- G - Substrato de WGA + carbodiimida. El crecimiento de fibras nerviosas sobre este substrato es casi nulo, sin embargo las células no nerviosas migran y crecen independientemente del explante original (G1). Una vista de detalle de otro explante (G2) muestra que cuando las fibras nerviosas logran crecer fuera del explante, estas son extremadamente delgadas y rectas sin ninguna ramificación ni interconexiones entre sí.
- H - Substrato de PWM + carbodiimida. Inexistente crecimiento nervioso y de otros tipos celulares es observado sobre este substrato (H1). Si se logran desarrollar algunas fibras nerviosas (H2) estas son poco desarrolladas, sin ramificaciones y cortas, generalmente van acompañadas de células gliales (H2).
- I - Substrato de UeAf + carbodiimida. Crecimiento asimétrico de fibras nerviosas, las cuales son delgadas y rectas. Las células gliales migran fuera del explante pero en forma escasa.

d). **Lectinas con especificidad a fucosa**

UeAf (Figura 7, I). Sobre este sustrato se desarrollan neuritas largas y con tendencia al crecimiento aislado. El desarrollo de células gliales es escaso.

De todas estas observaciones podemos resumir los siguientes resultados:

- Los sustratos formados por lectinas con reconocimiento a manosa y glucosa son soportes que favorecen el crecimiento neurítico. Las fibras formadas sobre estas lectinas se presentan en forma aislada y forman compactas redes nerviosas.
- Los sustratos formados por lectinas con especificidad a glucosamina y ácido neuroamínico son soportes que inhiben el crecimiento nervioso.
- En un nivel intermedio entre los dos casos anteriores se encuentran los sustratos de lectinas con reconocimiento a galactosa, galactosamina y fucosa. Sin embargo, existen ciertas diferencias en el crecimiento inducido por cada una de ellas.

3. Inhibición por monosacáridos específicos.

Se escogió una lectina de cada uno de los 4 grupos de la sección precedente y se probó su especificidad, agregando al medio de cultivo el monosacárido específico. Para cada uno de estos experimentos se aplicó la misma cantidad de glúcido a un cultivo realizado sobre polilisina + carbodiimida (cultivo control).

Manopiranosida sobre sustratos de Con A (Figura 8). A pesar de que se utilizó la concentración reportada como de saturación (100 mM) para la lectina probada (Koda y Partlow, 1976; Letourneau, 1979; Carbonetto y Argon, 1980) ésta concentración no fué efectiva para inhibir el crecimiento neurítico sobre el sustrato de Con A. Es decir, como se observa en la Figura 8 A, las fibras nerviosas durante las primeras 24 horas en cultivo sobre un sustrato de Con A crecen con el patrón característico descrito con anterioridad y si en ese momento se agrega 100 mM de manopiranosida y se observa el explante 24 horas después, las fibras nerviosas han continuado su desarrollo sin ningún cambio notorio que sea producido por el azúcar.

La Figura 8 B muestra el cultivo control con la adición del glúcido y de forma similar el crecimiento neurítico no parece ser alterado por dicha concentración de azúcar después de estar expuestos 24 hrs.

Glucosamina sobre WGA (Figura 9). Se observa que las células gliales se desplazan más allá del explante ganglionar y que algunas fibras nerviosas crecen agrupadas. Si se compara este crecimiento con el observado sobre el simple sustrato de WGA (Figura 7 G1 y G2) se observa que 300 mM de glucosamina solo produce una inhibición parcial al agregarse en cultivos realizados sobre un sustrato de WGA.

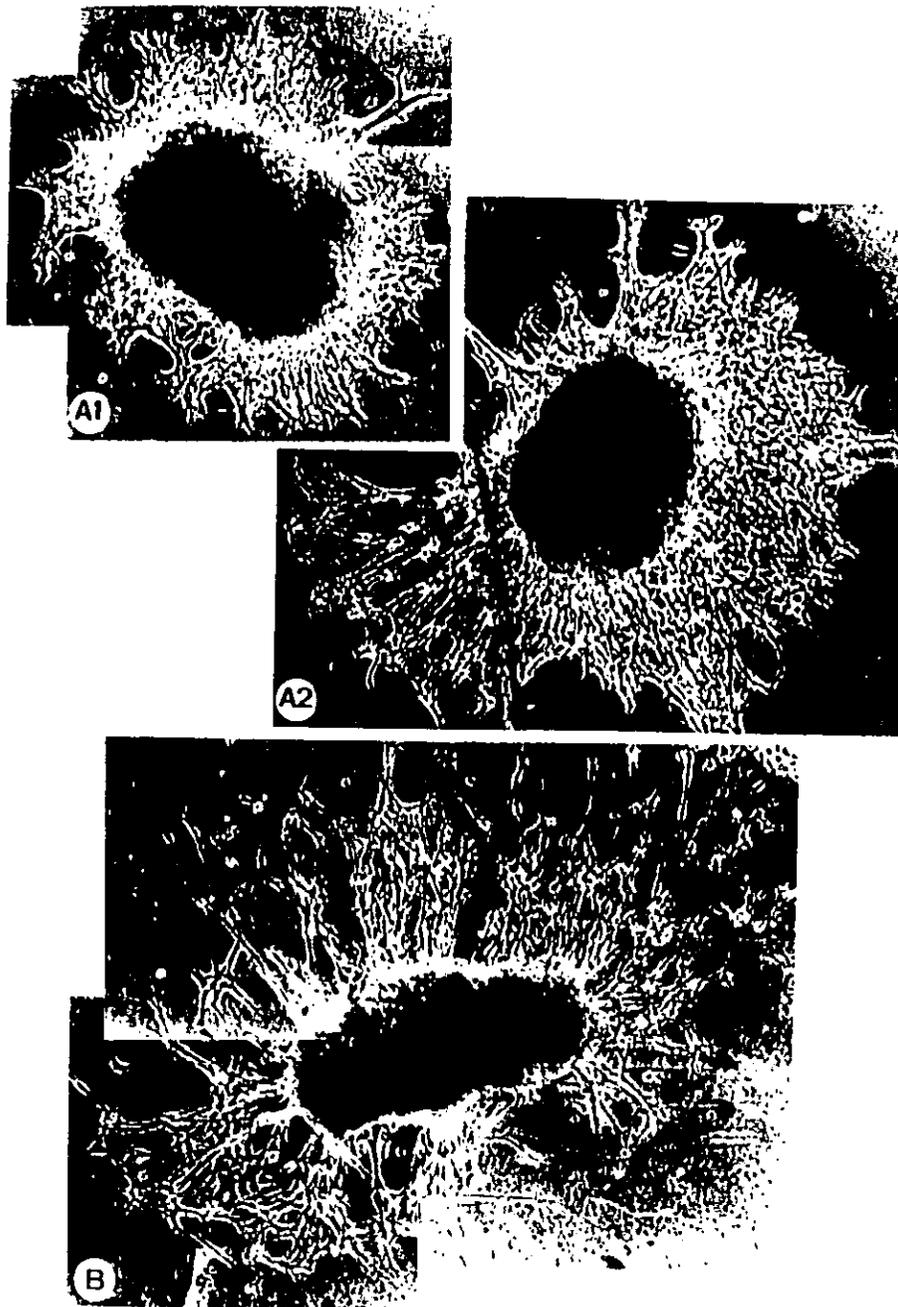


Figura 8 - Microfotografías de explantes ganglionares cultivados en presencia de medio de cultivo + 100 mM de mannopiranoside. Los explantes fueron cultivados en medio control durante 24 horas, momento en el cual se agregó el azúcar.

A1 y A2 - Explantes cultivados sobre un substrato de Con A + carbodiimida. Antes del sacárido (A1) y 24 horas después de la presencia del mismo (A2). Obsérvese que el crecimiento de fibras nerviosas y células gliales persiste sin cambios notorios debidos a la maniobra realizada.

B - Explante cultivado sobre un substrato de polilisina + carbodiimida despues de 24 horas de exposición al monosacárido. En este caso tampoco parece haber un notable efecto debido a la presencia del sacárido en el medio de cultivo.

Barr a negra en A2 corresponde a 50 μ m.

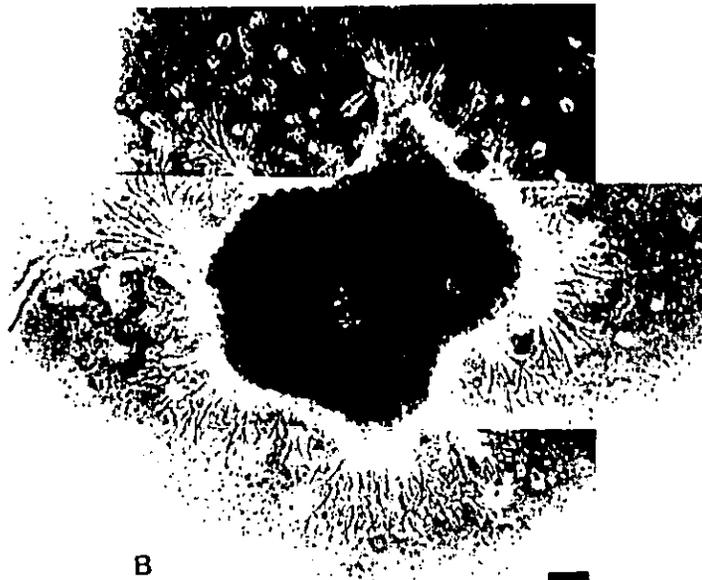
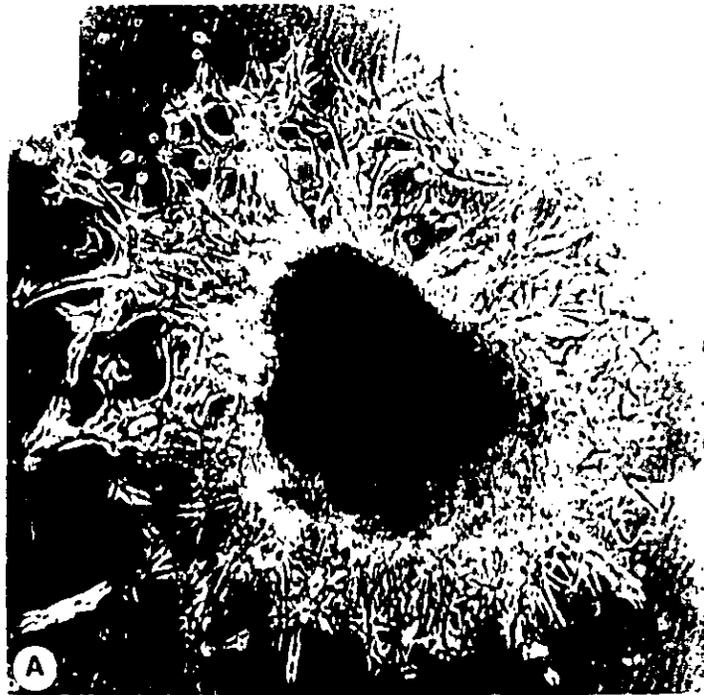


Figura 9 - Microfotografías de explantes ganglionares cultivados en presencia de medio de cultivo + 300 mM de glucosamina. Los explantes fueron cultivados en medio control durante 24 horas, momento en el cual se agregó el azúcar.

A - Explante cultivado sobre un substrato de WGA + carbodiimida después de 24 horas de exposición al monosacárido. El crecimiento de fibras nerviosas y células gliales es notablemente mejor que el observado antes de agregar el azúcar durante las mismas horas de cultivo (Fig 7 G).

B - Explante cultivado sobre un substrato de polilisina + carbodiimida después de las 24 horas de exposición al monosacárido. En este caso el crecimiento de fibras nerviosas se ve poco alterado comparado con explantes que no tuvieron la adición del azúcar (Fig 6 A).

Barra negra en B corresponde a 50 μ m.

Estos resultados sugieren que cierta cantidad del azúcar se fijó sobre el sustrato de cultivo y de esta forma las fibras nerviosas y las células gliales crecieron fuera del explante sin que se vieran inhibidas por la lectina, como fue el caso cuando crecieron directamente sobre la WGA.

La glucosamina agregada sobre un sustrato de polilisina inhibe el crecimiento neuronal (Figura 9 B) en comparación al crecimiento observado sobre el sustrato control (Figura 6, A1 y A2).

Galactosida sobre sustrato de PNA (Figura 10). El crecimiento de fibras nerviosas en estas condiciones presenta largas y aisladas fibras y células gliales alrededor del explante. Si comparamos estos resultados y el crecimiento de fibras obtenidas en un cultivo en ausencia del monosacárido (Figura 7 D1 y D2) observamos que éste actúa revirtiendo el efecto provocado por la lectina en sustrato.

Por otro lado, la galactosida no influye en el desarrollo neuronal de explantes cultivados sobre un sustrato de polilisina como se observa en la Figura 10 B en comparación con la Figura 6.

Fucosa sobre sustrato de UeAf (Figura 11). Las fibras nerviosas son numerosas y agrupadas. Las células gliales se presentan en la periferia inmediata del explante.

La fucosa inhibe el crecimiento de fibras nerviosas sobre el sustrato control, pero no a las células gliales.

En resumen, el efecto de diversos sustratos de lectinas sobre el crecimiento global de los explantes ganglionares no se puede inhibir consistentemente con sus azúcares específicos correspondientes, aún cuando éstas se utilizan a concentraciones de saturación. Los azúcares utilizados sobre el sustrato de polilisina en algunos casos alteran el crecimiento neuronal.

4. Efecto de glucosidasas.

Las modificaciones inducidas por la adición de manosidasa al medio del cultivo se pueden observar en la Figura 12. Sobre un sustrato de Con A (parte A) las fibras nerviosas detienen su crecimiento después de 30 minutos de exposición a la enzima. Después de una hora, las neuritas se adelgazan y las células neuronales cambian de forma, la cual era originalmente aplanada a una forma globular.

Durante la siguiente hora de cultivo, las fibras continúan sin moverse, sin embargo las células gliales se retractan aún más. Después de 4 horas de

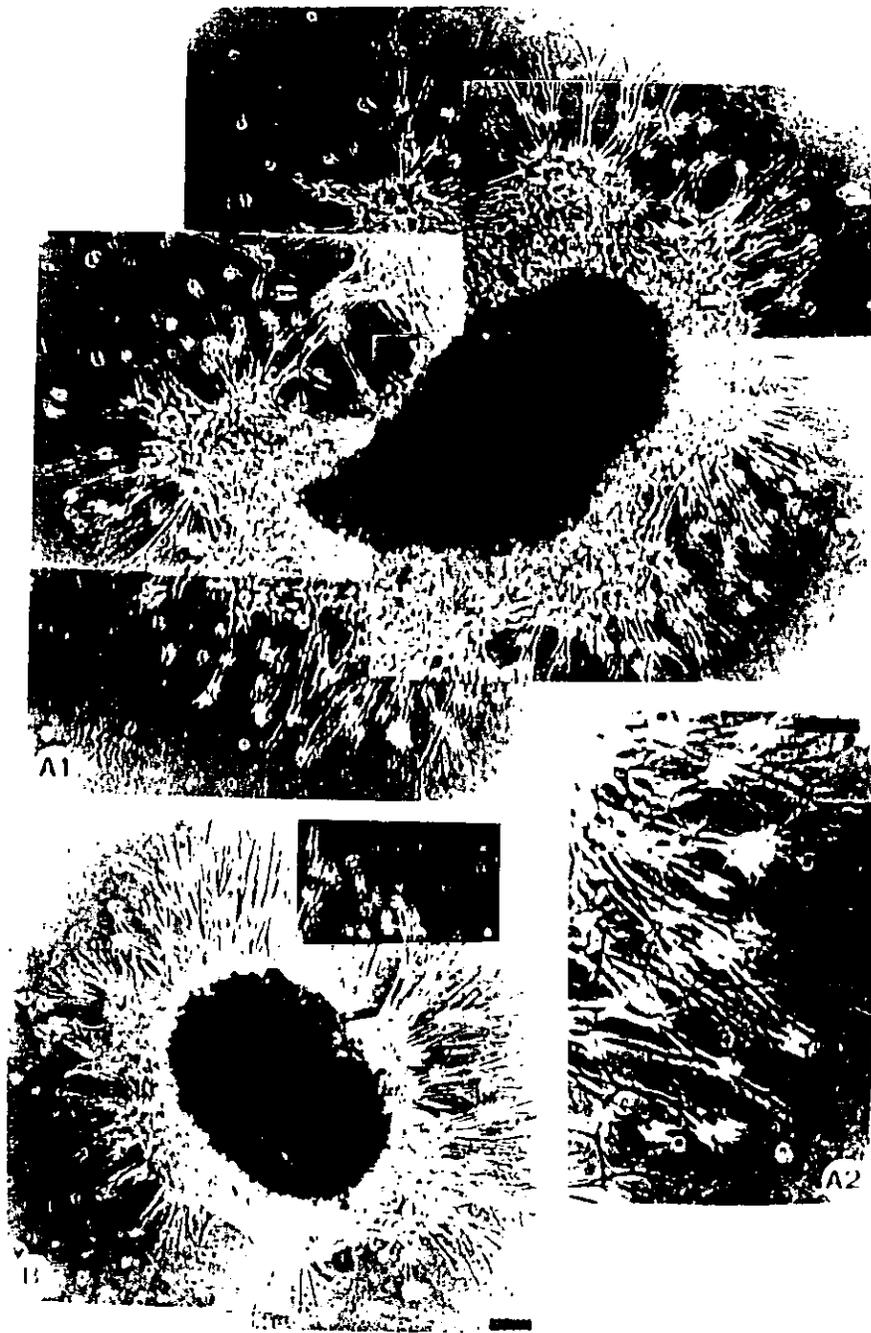


Figura 10 - Microfotografías de explantes ganglionares cultivados en presencia de medio de cultivo + 400 mM de galactosida. Los explantes fueron cultivados en medio control durante 24 horas, momento en el cual se agregó el azúcar.

A1 y A2 - Explante cultivado sobre un sustrato de PNA + carbodiimida después de 24 horas de exposición al monosacárido. Con esta maniobra se observa un notable crecimiento tanto de fibras nerviosas como de células gliales alrededor de todo el explante.

B - Explante cultivado sobre un sustrato de polilisina + carbodiimida después de 24 horas de exposición al monosacárido. En este caso el crecimiento de fibras nerviosas no se ve alterado por la presencia del sacárido y es comparable al grupo experimental (A).

Barra negra en A2 corresponde a 50 μ m.

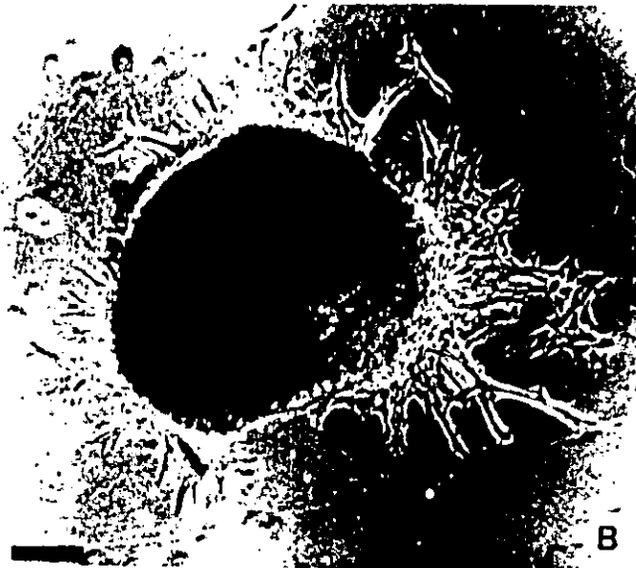
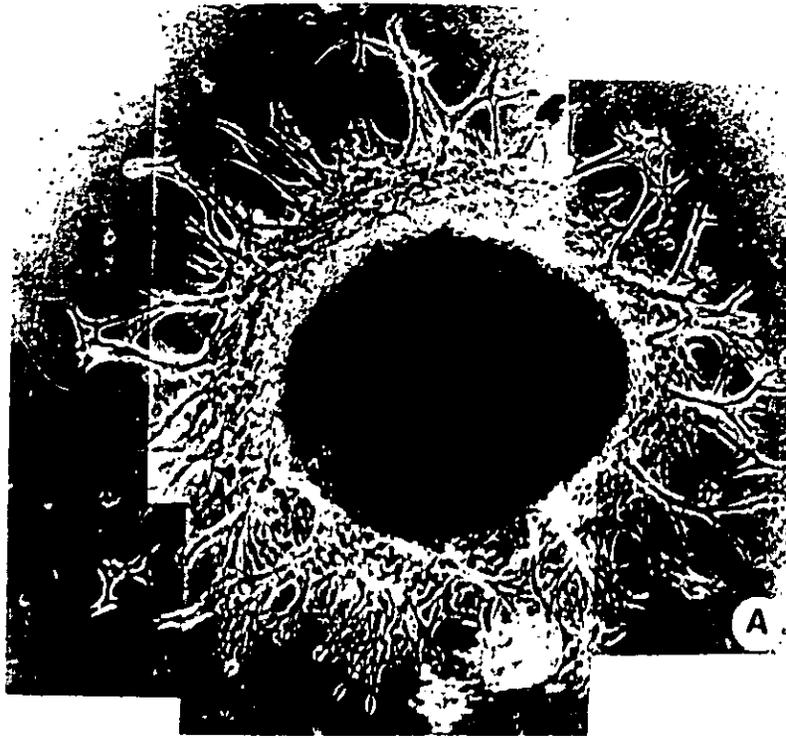


Figura 11 - Microfotografías de explantes ganglionares cultivados en presencia de medio de cultivo + 200 mM de fucosa. Los explantes fueron cultivados en medio control durante 24 horas, momento en el cual se agregó el azúcar.

A - Explante cultivado sobre un sustrato de UeAf + carbodiimida después de 24 horas de exposición al monosacárido. En este experimento se observa que la adición del azúcar permitió que las fibras nerviosas así como las células gliales crecieran sin ninguna inhibición.

B - Explante cultivado sobre un sustrato de polilisina + carbodiimida después de 24 horas de exposición al monosacárido. La adición del azúcar inhibe el crecimiento normal del explante sobre este tipo de sustrato.

Barra: negra en B corresponde a 50 μ m.

exposición a la glucosidasa (no mostrado en la foto) la mayor parte de los explantes se despegan parcial o totalmente. Sin embargo, si se reemplaza el medio de cultivo por un medio sin manosidasa durante las dos primeras horas del experimento, el efecto provocado es aún reversible.

Por otro lado, si el experimento se realiza sobre un sustrato control (parte B), no se observa ningún efecto en el crecimiento. Es decir, las fibras nerviosas continúan creciendo y las células gliales se siguen desplazando y conservan su forma aplanada típica.

En resumen, el crecimiento de explantes ganglionares sobre un sustrato de Con A depende de la unión específica de éste con los grupos de tipo manosa del sustrato. Por eso al aplicar la manosidasa se induce en primer lugar la detención del crecimiento para terminar con el desprendimiento del explante.

5. Neuronas Disociadas.

Con A - La morfología de neuronas disociadas y cultivadas sobre un sustrato de Con A varía dependiendo del curso temporal del cultivo. Las células nerviosas se adhieren rápidamente sobre este tipo de sustrato. Después de algunas horas (12 en nuestros experimentos) las células emiten numerosas neuritas alrededor del soma celular (Figura 13, A1). La mayoría de estas prolongaciones se retraen horas más tarde en forma espontánea y terminan desapareciendo completamente o formando un velo muy fino (lamela) alrededor del soma celular. Sólo 1 ó 2 de las neuritas formadas continúan a desarrollarse y formar bifurcaciones (A2). Esta última morfología se conservó durante las 48 hrs de observación de nuestros cultivos.

En los cultivos de neuronas disociadas, las neuritas formadas sobre los sustratos de Con A son más largas y con mayor número de bifurcaciones que sobre un los sustratos de polilisina (Figura 13 B).

Si se agrega manosidasa al medio de cultivo después de haber cultivado durante 20 horas sobre un sustrato de Con A (Figura 13 C) se observa que después de algunas horas las neuritas se despegan (flecha). Finalmente, si no se quita la exposición a la enzima se termina por despegar toda la célula.

La aplicación de 100 mM de manopiranosida al medio de cultivo, después de 4 horas de iniciado el cultivo sobre un sustrato de Con A, provoca un retardo en el crecimiento neuronal. Efecto que es observado después de 24 horas de exposición al glúcido (Figura 13, D1). En cambio sobre un sustrato de polilisina este azúcar no parece tener efecto sobre el crecimiento neuronal (D2).

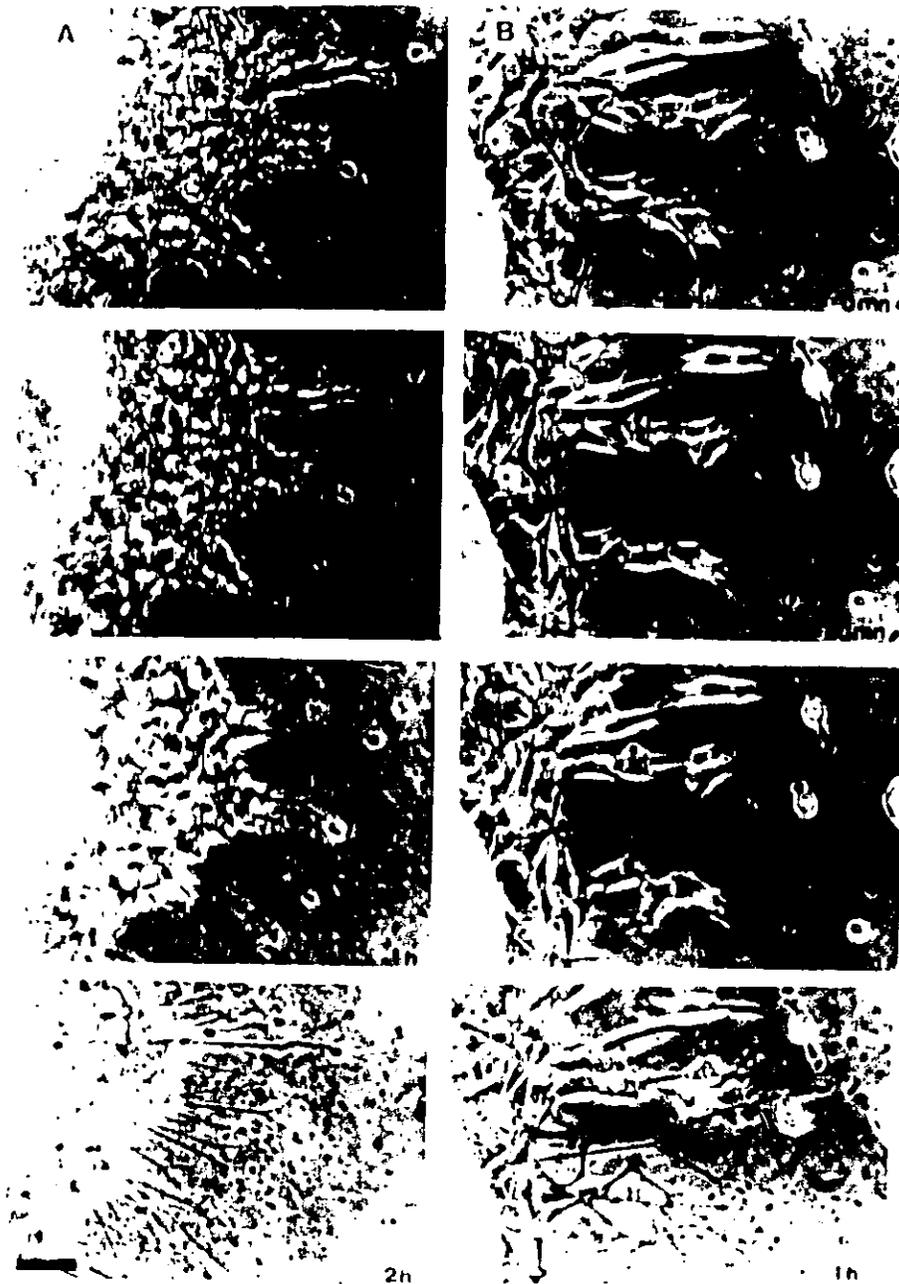


Figura 12 - Microfotografías de fragmentos de explantes ganglionares cultivados durante 24 horas en medio control. A partir del minuto cero se agrega al medio de cultivo 0.4 U/ml de mannosidasa y se toman fotografías a tiempos determinados de la misma zona.

A - Explante cultivado sobre un substrato de Con A + carbodiimida.

B - Explante cultivado sobre un substrato de polilisina + carbodiimida.

Sobre el substrato de Con A después de 30 minutos de exposición a la enzima, las fibras nerviosas se detienen y entre la primera y la segunda hora de exposición, las células gliales se retraen mientras que las neurites se adelgazan sin moverse. Sobre un substrato de polilisina el crecimiento de ambos tipos neuronales no parece ser afectado por la adición de la enzima. Barra negra en microfotografía inferior izquierda corresponde a 20 μ m.



Figura 13 - Neuronas disociadas de ganglios nerviosos dorsales de embrión de pollo.

A1 y A2 - Substrato de Con A + carbodiimida. La misma neurona con 12 horas (A1) y 24 horas de cultivo (A2). Sólo una de las prolongaciones nerviosas (flecha en A1) continua creciendo durante el cultivo y se ramifica varias veces en ese periodo (A2).

B - Doble substrato: polilisina + carbodiimida (izquierda) y Con A + carbodiimida (derecha). Las neuronas cultivadas durante 24 horas muestran diferencias en crecimiento neurítico, siendo más desarrolladas aquéllas que se adherieron al substrato de la lectina.

C - Substrato de Con A + carbodiimida. El cultivo se mantuvo durante 20 horas en medio normal. Dos horas después de agregar 0.4 U/ml de mannosidasa la neurona permanece unida al substrato al igual que su neurita principal pero una ramificación (flecha) se despegó.

D1 - Substrato de Con A + carbodiimida. El cultivo se mantuvo durante 4 horas en medio normal, entonces se agrega 100 mM de manopiranoside. La fotografía fué tomada 20 horas después y se observa un escaso desarrollo neuronal.

D2 - Doble substrato: polilisina + carbodiimida (izquierda) y Con A + carbodiimida (derecha), 4 horas con medio normal, entonces se agregó 100 mM de manopiranoside. Después de 20 hrs. se observa un escaso desarrollo neuronal sobre Con A y crecimiento normal sobre polilisina.

TABLA VI.- MEDIAS Y ERRORES ESTÁNDARES DE LOS 7 PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.CULTIVOS DE NEURONAS DISOCIADAS.

Sustrato (concentración)	Polilisina (10 µg/ml)	Con A (50 µg/ml)	WGA (50 µg/ml)	PNA (50 µg/ml)	UeA-f (50 µg/ml)	Carbodiimida (5 mg/ml)
	n=280	n=278	n=244	n=244	n=240	n=250
Ocupación espacial (O.E.)						
Área (AOE) (µm ²)	11560.23	15902.64	8744.62	8115.25	8140.45	9294.14
± EEM	±681.41	±949.19	±540.79	±646.15	±672.17	±523.36
Perímetro (POE) (µm)	613.28	827.68	483.21	476.79	479.03	502.09
± EEM	±32.75	±93.73	±27.35	±33.24	±33.66	±24.19
Factor de Forma (FF)	437.76	358.22	508.79	503.29	485.72	494.78
± EEM	± 18.61	±16.61	±18.73	±23.31	±21.19	±17.65
Forma Global (FG)	0.39	0.43	0.29	0.34	0.30	0.24
± EEM	±0.02	±0.03	±0.02	±0.03	±0.03	±0.02
Número de neuritas (Nn)	1.40	1.31	1.11	1.25	1.30	1.22
± EEM	±0.06	±0.06	±0.06	±0.06	±0.08	±0.06
Número de bifurcaciones (Nb)	0.56	1.22	0.23	0.13	0.17	0.20
± EEM	±0.08	±0.12	±0.08	±0.05	±0.06	±0.06
Longitud total de las neuritas (Ln) (µm)	234.82	339.16	134.10	134.10	145.68	152.23
± EEM	±24.33	±25.30	±11.91	±13.96	±13.53	±11.70

n, número de células analizadas.

B).- ANÁLISIS CUANTITATIVO DEL DESARROLLO NEURONAL SOBRE CULTIVOS DE NEURONAS DISOCIADAS.

Este análisis se desarrolló para 4 lectinas, las cuales poseen diferentes especificidades a monosacáridos (Con A, WGA, PNA y UeAf) y para dos grupos control (polilisina y carbodiimida).

1. Medias y errores estándares.

La Tabla VI resume los valores obtenidos de las medias y los errores estándares para cada sustrato y cada parámetro analizado. Los principales resultados obtenidos son:

- El sustrato de Con A modifica todos los parámetros de ocupación espacial y dos de las características morfométricas de las neuritas (Nb y Ln). Los parámetros AOE, POE, Nb y Ln aumentan de manera significativa, pero el número de neuritas no cambia.
- Las otras 3 lectinas (WGA, PNA, UeAf), muestran disminución en los valores promedios de los parámetros neuríticos (Nb y Ln) y de forma celular (AOE y POE). Es de notar que el valor promedio del parámetro Nn solo se encuentra significativamente reducido para la lectina WGA.
- La polilisina favorece el crecimiento neurítico en comparación de la carbodiimida, pero este efecto es intermedio entre el producido por Con A y las otras lectinas.

2. Tipos de distribución.

Se determinó la distribución de las poblaciones neuronales para cada parámetro estudiado (Figuras 14 a 19). Las distribuciones de tipo Poisson se presentan en los parámetros: forma global, número de neuritas y número de bifurcaciones. Para los otros cuatro parámetros (AOE, POA, FF y Ln) la distribución es de tipo Gaussiana o normal.

3. Comparación de varianzas y medias.

Se realizó esta comparación para todos los parámetros morfométricos y los sustratos estudiados. Los resultados obtenidos de este estudio se señalan en las diferencias significativas de la tabla VI.

Análisis sustrato versus sustrato

La polilisina es significativamente diferente de la lectina Con A para casi todos los parámetros estudiados ($p < 0.01$), excepto para FG y Nn. Excepto raras excepciones la polilisina también presenta diferencias significativas en todos los parámetros morfométricos en comparación con las otras lectinas estudiadas.

Las lectinas WGA, PNA y UeAf, no presentan diferencias significativas entre ellas con sólo algunas excepciones en algunos parámetros de forma celular.

Mientras que con respecto a la lectina Con A son significativamente diferentes en la mayoría de los parámetros ($p < 0.01$).

La carbodiimida es significativamente diferente de la polilisina y de la lectina Con A para todos los parámetros sin excepción ($p < 0.01$). Por otro lado, no hay diferencias significativas entre la carbodiimida y las otras 3 lectinas ($p < 0.05$) (excepto el caso de Nn en WGA).

Con este análisis, podemos dividir los sustratos estudiados en dos grandes grupos. El primero para la lectina Con A como un sustrato que globalmente estimula el crecimiento neuronal, mientras que las otras lectinas estudiadas y la carbodiimida al inhibir el crecimiento pertenecen al segundo grupo.

Análisis parámetro versus parámetro

El parámetro FG no muestra ninguna diferencia significativa entre los diversos sustratos estudiados. Por lo tanto podemos concluir que este no es un parámetro discriminante.

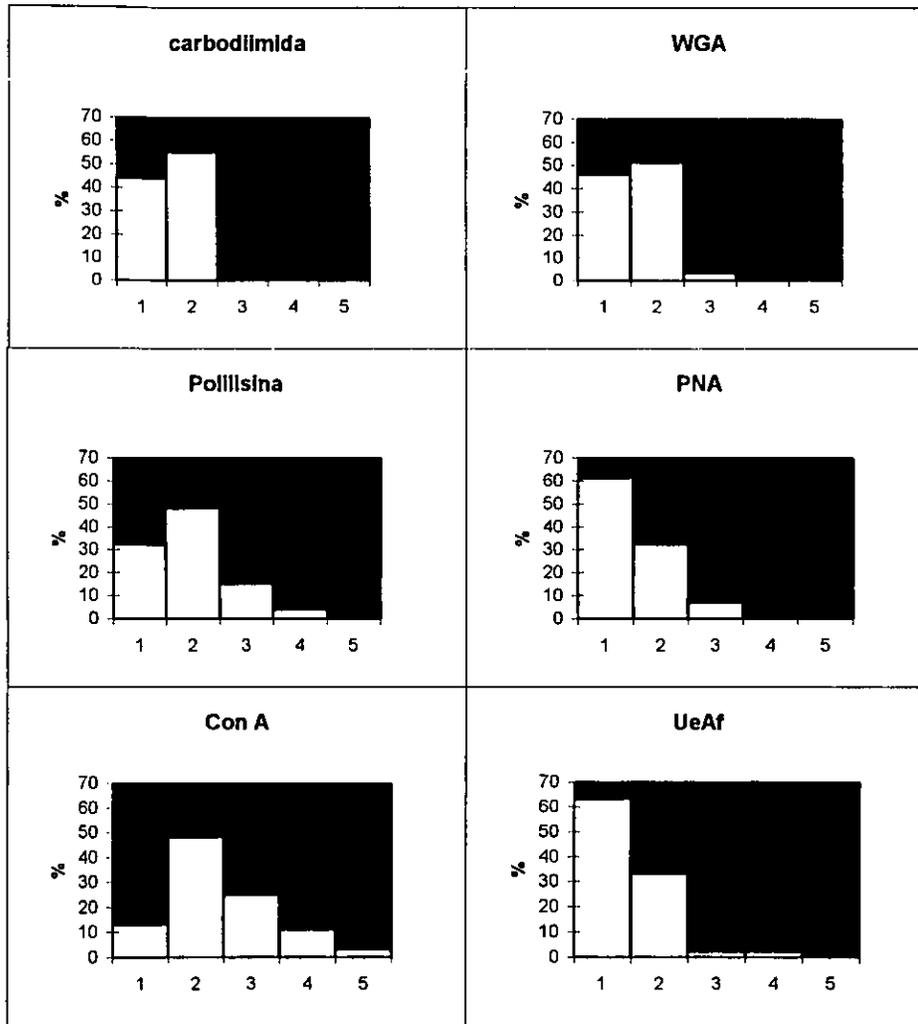
Los valores obtenidos para los otros tres parámetros topológicos varían en función de tipo de sustrato utilizado. Por lo tanto se consideran como parámetros discriminantes a AOE, POE y FF.

Los 3 parámetros neuríticos estudiados son parámetros considerados discriminantes para los grupos experimentales. Sin embargo, la poca variabilidad de Nn, nos muestra que éste es un parámetro con menor peso que los parámetros Nb y Ln.

4. Análisis factorial de correspondencias (AFC).

Para cada uno de los parámetros (excepto Nn) se realizó un AFC que se interpretó con ayuda de los histogramas de distribución correspondientes para cada sustrato.

AFC de la AOE (Figura 14). Las clases 1 y 2 graficadas en el primer plano de correspondencia agrupan la mayoría de las células. Las clases 3, 4 y 5 presentan un pequeño peso para la mayoría de los sustratos estudiados. Sin embargo, en la zona formada por estas últimas 3 clases se localiza la población de neuronas cultivadas sobre la lectina de Con A.



CLASE	Intervalo
1	0-8000
2	8000-16000
3	16000-24000
4	24000-32000
5	32000-40000

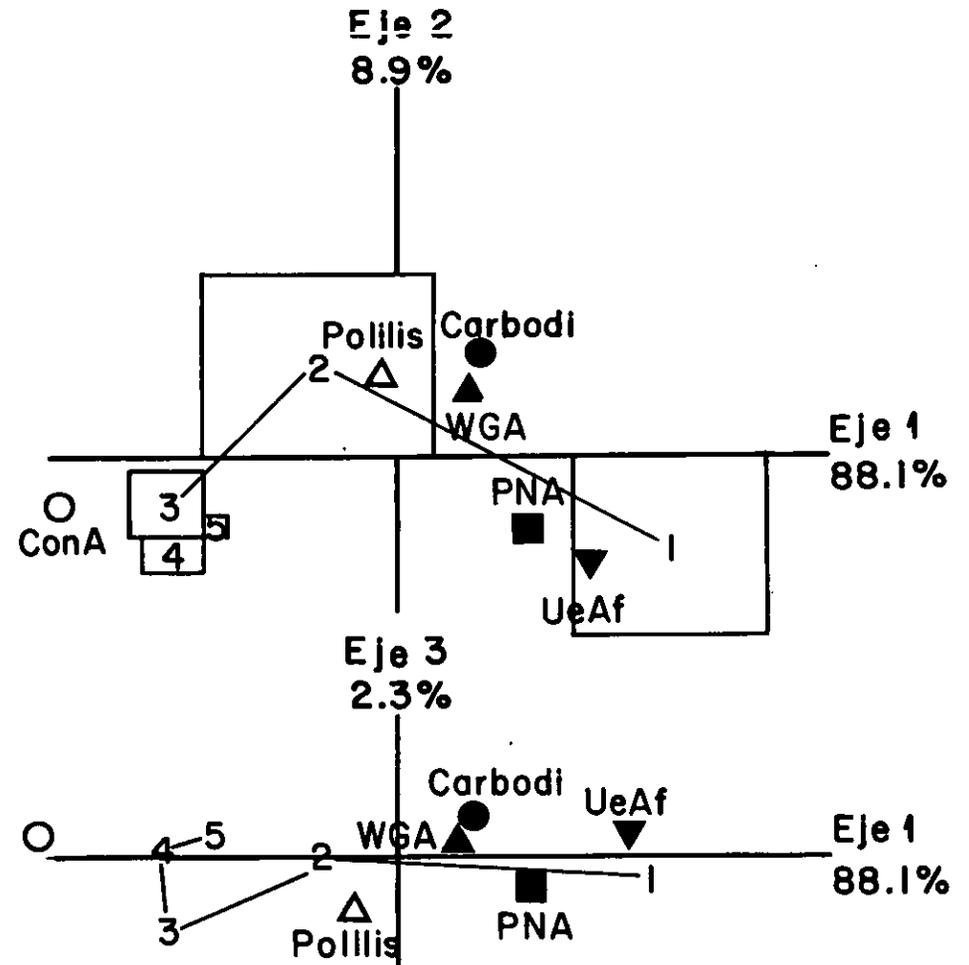


Figura 14 - Análisis factorial de correspondencias del área de ocupación espacial (AOE) e histogramas de distribución de frecuencias del AOE.

La población neuronal cultivada sobre polilisina se localiza próxima a la clase 2 (800-1600 μm^2). En cambio las poblaciones pertenecientes a los otros 4 substratos se localizan entre las 2 primeras clases. Así, las posiciones de la carbodiimina y de la WGA están en la vecindad de la clase 2 y la de PNA y UeAf más bien cerca de la clase 1 (la más pequeña superficie).

En resumen, la población de neuronas cultivadas sobre la lectina de Con A es aquella donde las neuronas ocupan la mayor superficie y es seguida en orden decreciente por las neuronas cultivadas sobre polilisina, WGA, carbodiimina, PNA y UeAf en último lugar.

AFC del POE (Figura 15). La aportación de elementos para las clases 5 y 6 de esta AFC es inexistente a excepción de algunos elementos provenientes de Con A y de polilisina. Por otro lado, las clases 1 y 2 poseen la mayoría de los elementos. En la zona formada por estas dos clases se localizan todas las células provenientes a todos los substratos excepto a Con A las cuales se localizan cerca de la clase 3 (1200 a 1800 μm).

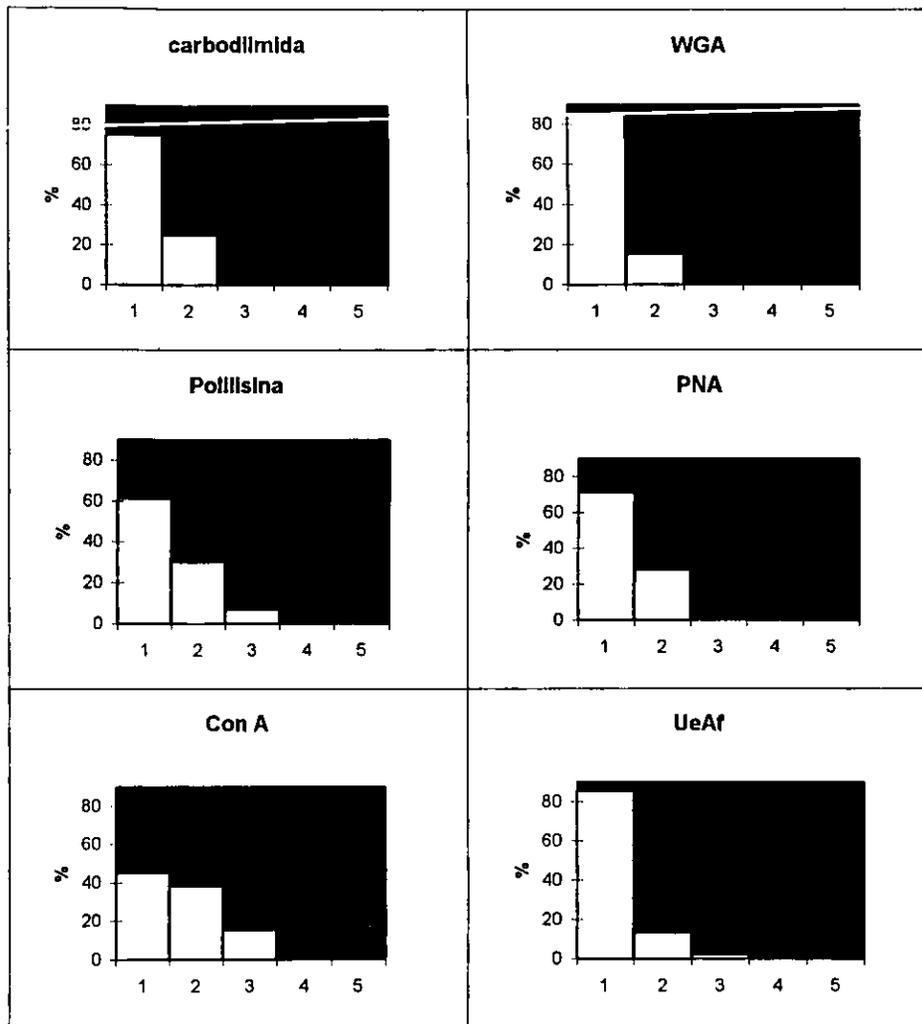
Las poblaciones neuronales de cultivos realizados sobre UeAf, WGA y carbodiimina están comprendidas dentro de la clase 1 (0-600 μm) después se localizan la polilisina y la PNA entre las clases 1 y 2 acercándose la primera más a la clase 1 y la segunda a la clase 2.

Si clasificamos los substratos que inducen neuronas con un mayor perímetro hasta aquellas con menor perímetro obtenemos: Con A, PNA, polilisina, WGA, UeAf y carbodiimida.

AFC de la FF (Figura 16). El valor del factor de forma varía entre 0 y 1000, correspondiendo un valor de 1000 a un círculo perfecto. La gráfica de AFC para el primer plano de correspondencia muestra que los valores intermedios son los más frecuentes. Por lo tanto, la clase 3 (400-600) agrupa el mayor número de células. Entre las clases 2 y 4 se encuentran todos los substratos utilizados excepto la Con A.

La Con A está completamente alejada de los otros substratos y la localizamos en la cercanía de la primera clase (0-200), lo cual nos representa una forma neuronal muy irregular.

La polilisina se encuentra entre la clase 2 y 4 opuesta en el eje 2 de la clase 3. En cambio, las poblaciones de WGA, UeAf y carbodiimida se agrupan cerca o dentro de la clase 3, mientras que la PNA muestra una distribución con el mayor valor de FF, es decir, en la cercanía de la clase 4, lo cual indica que las neuronas que crecen sobre esta lectina son de forma más regular comparadas con las de los otros substratos.



CLASE	Intervalo
1	0-600
2	600-1200
3	1200-1800
4	1800-2400
5	2400-3000

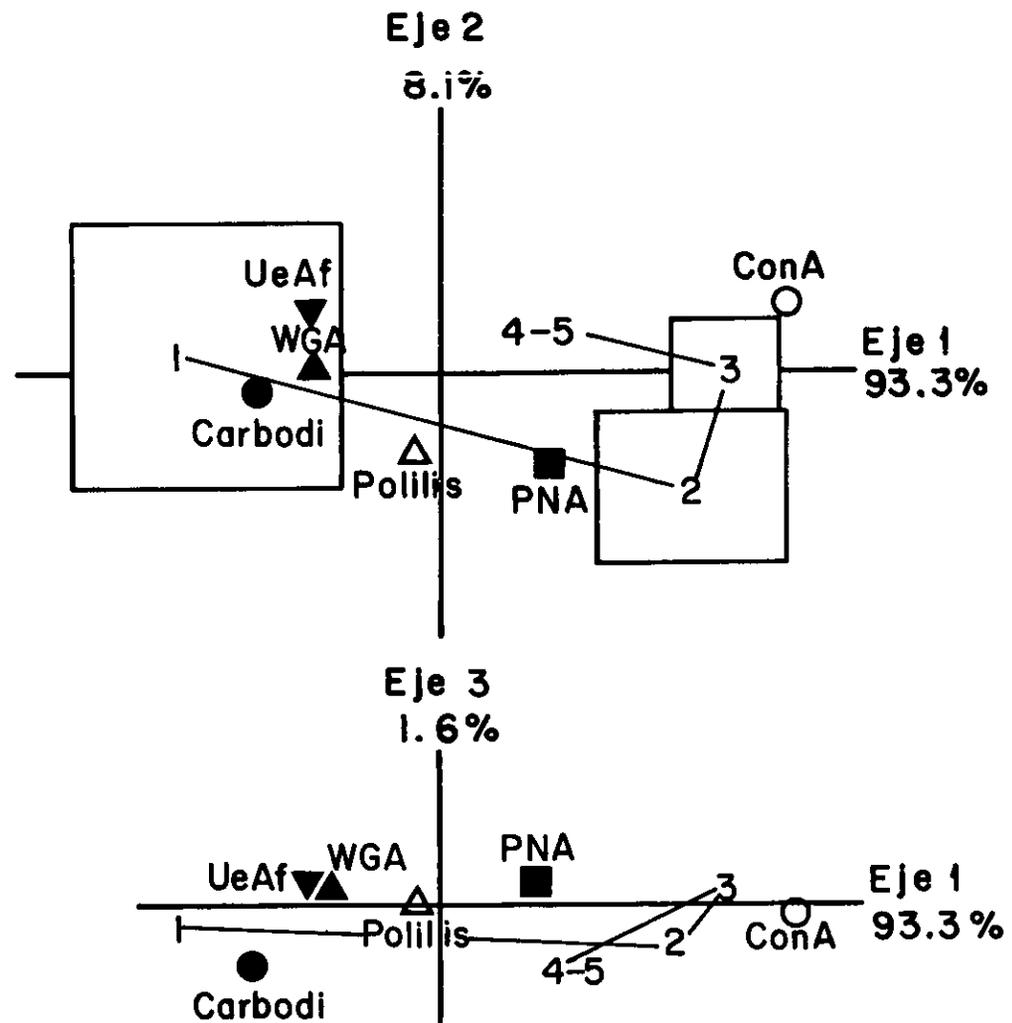
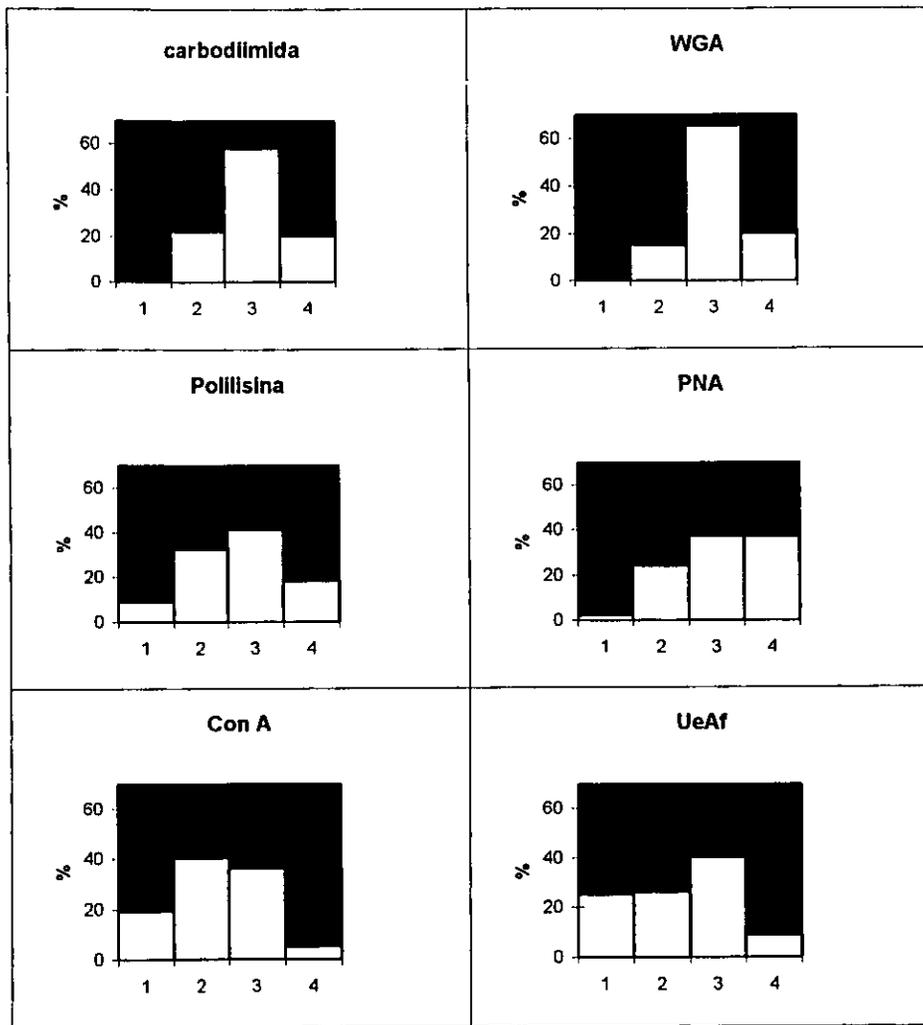


Figura 15 - Análisis factorial de correspondencias del perímetro de ocupación espacial (POE) e histogramas de distribución de frecuencias del POE.



clase	intervalo
1	0-200
2	200-400
3	400-600
4	600-800

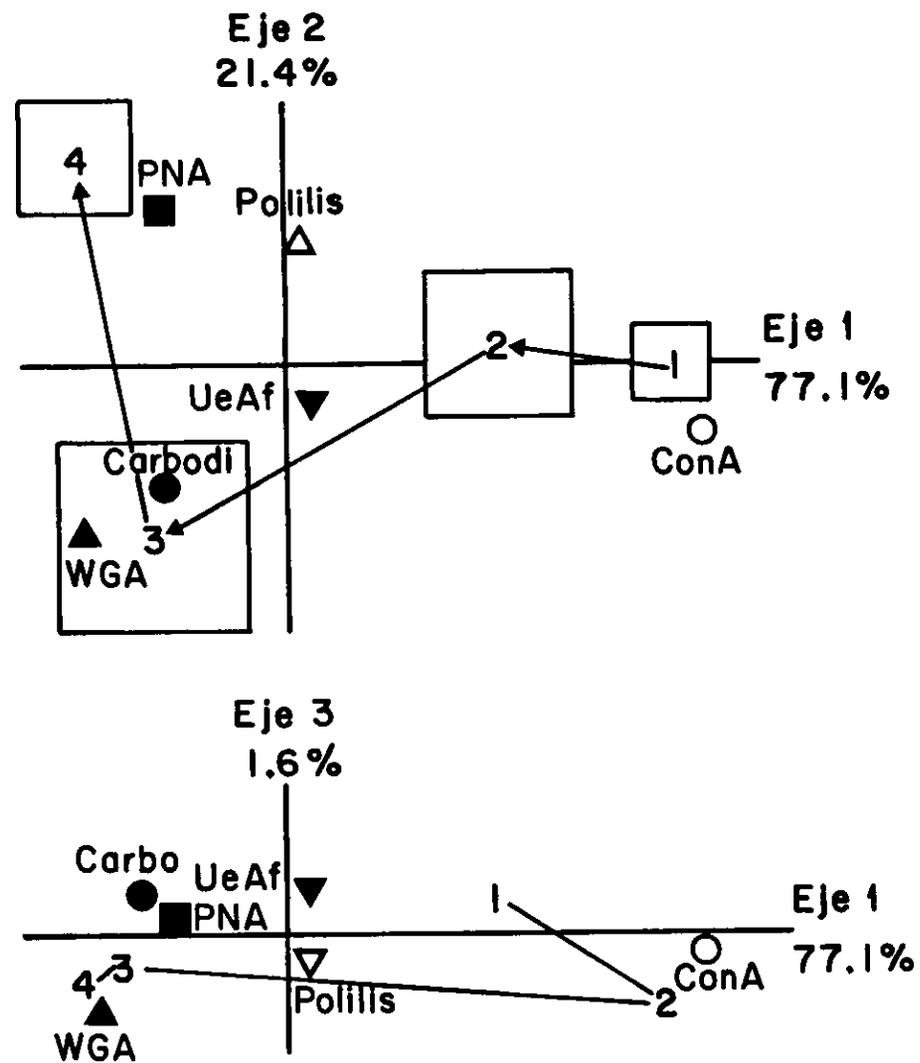


Figura 16 - Análisis factorial de correspondencias del factor de forma (FF) e histogramas de distribución de frecuencias del FF.

El factor de forma celular nos clasifica los substratos de cultivo utilizados en 3 grandes categorías. La primera, aquella de substratos con neuronas de forma más o menos regular (PNA) seguida de substrato con neuronas menos regulares (carbodiimida, WGA, UeAf). Por último, la última categoría abarca a neuronas más irregulares y con más convulsiones (polilisina y Con A).

AFC de la FG (Figura 17). La distribución de las células para este parámetro es más homogéneo que las otras distribuciones de los parámetros de forma espacial. Por el contrario, las distancias entre los substratos es pequeña.

La carbodiimida, la WGA y la UeAf se localizan cerca de las clases 1 y 2 (0 a 0.4). La localización de la polilisina y de la Con A es más cercana de la cuarta clase (0.6 a 0.8). Únicamente la PNA se separa de los otros substratos, localizándose en el periferia de la clase 3 (0.4 a 0.6).

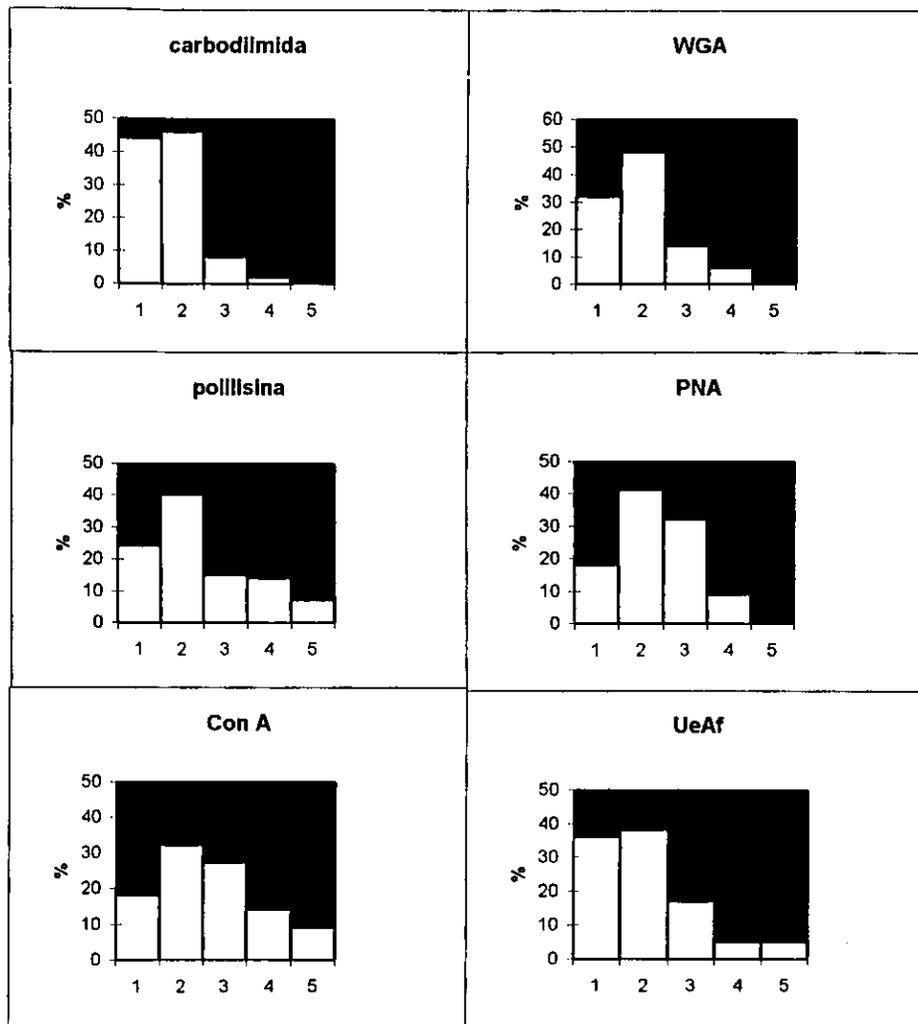
Estos resultados permiten clasificar los substratos respecto a la FG en 3 categorías. La primera que comprende a neuronas con formas alargadas (carbodiimida, WGA y UeAf). La segunda, intermedia, solamente representada por PNA y la última que comprende a la Con A y la polilisina, con neuronas con formas menos lineales.

AFC de Nb (Figura 18). Las poblaciones pertenecientes a cuatro substratos (carbodiimida, WGA, PNA y UeAf) se localizan cerca de la clase con menor número de bifurcaciones (0 a 1). La población de polilisina se sitúa entre esta clase y la siguiente (1 a 2).

Por último, la población de Con A se localiza cerca de las 3 últimas clases, lo cual sugiere la tendencia de estas neuronas en crecimiento a desarrollar un mayor número de bifurcaciones.

AFC de la Ln (Figura 19). La clasificación de substratos permanece igual para la obtenida para Nb. Sin embargo, la distribución de los elementos entre las primeras clases es más homogénea. Así, las poblaciones neuronales cultivadas sobre carbodiimida, WGA y PNA presentan longitudes de neuritas medias, es decir, entre 100 y 200 μm (es decir entre las clases 1 y 2). La poblacione perteneciente a UeAf se localiza netamente dentro de la clase 2. Por último, la polilisina con longitudes mayores de 200 μm queda aún alejada de la Con A, quien presenta los valores más grandes.

Todos los resultados de los AFC's realizados nos muestran una clara tendencia de la polilisina y de la lectina Con A a formar clases distintas para todos los parámetros estudiados respecto a los otros substratos. Estos últimos muestran tendencias distintas dependiendo del parámetro en estudio, pero aún con esas pequeñas diferencias se les puede clasificar en un tercer grupo distintivo de la polilisina y sobre todo de la Con A.



CLASE	intervalo
1	0-0.2
2	0.2-0.4
3	0.4-0.6
4	0.6-0.8
5	0.8-1.0

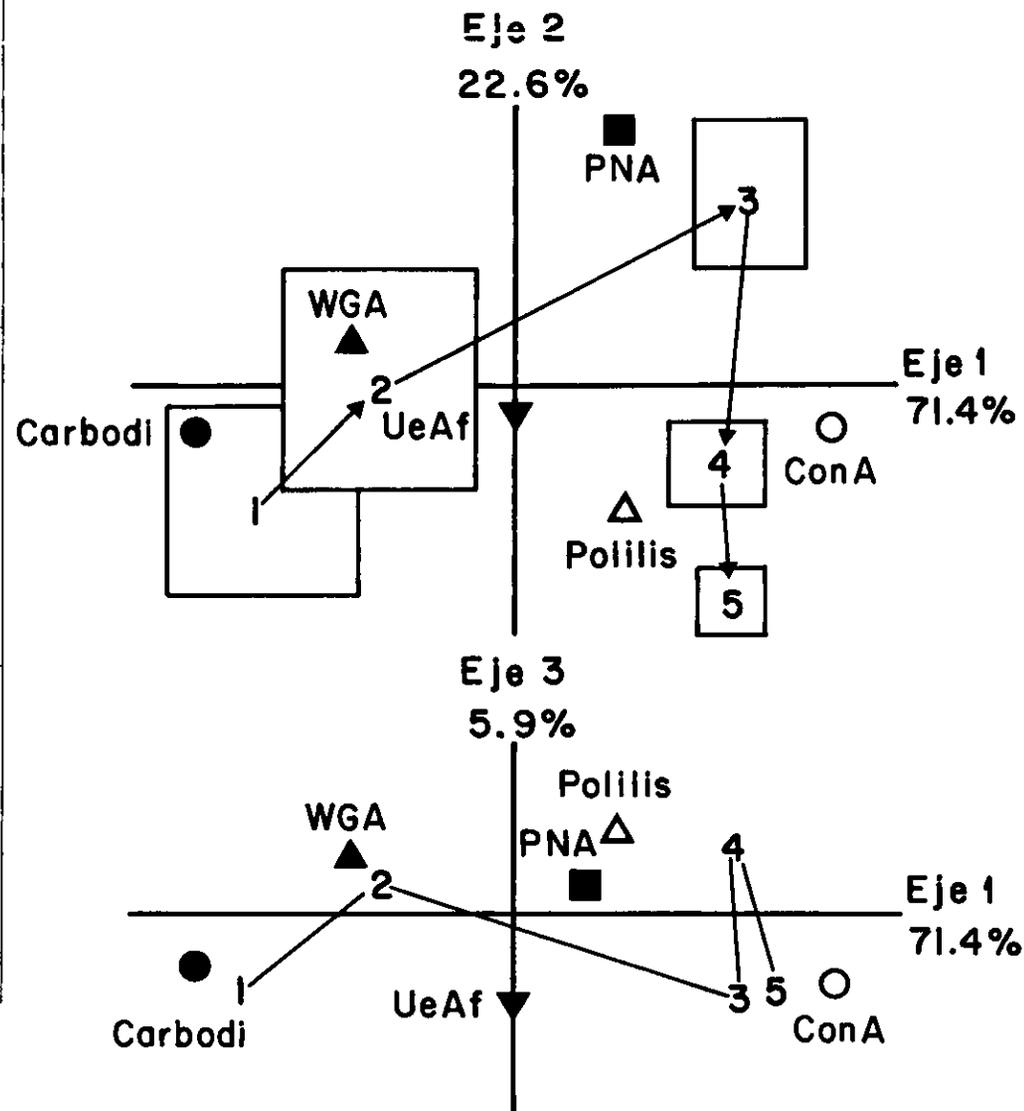
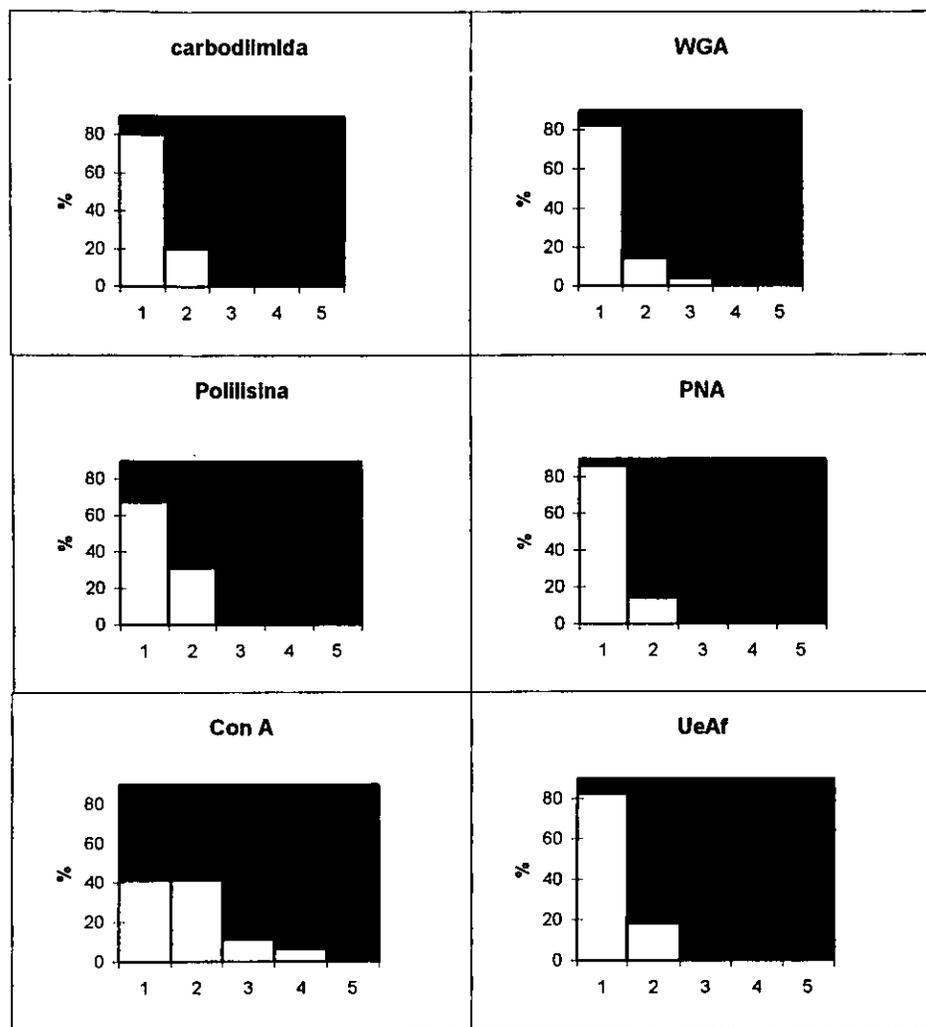


Figura 17 - Análisis factorial de correspondencias de la forma global (FG) e histogramas de distribución de frecuencias de la FG.



CLASE	intervalo
1	0-1.0
2	1.0-2.0
3	2.0-3.0
4	3.0-4.0
5	4.0-5.0

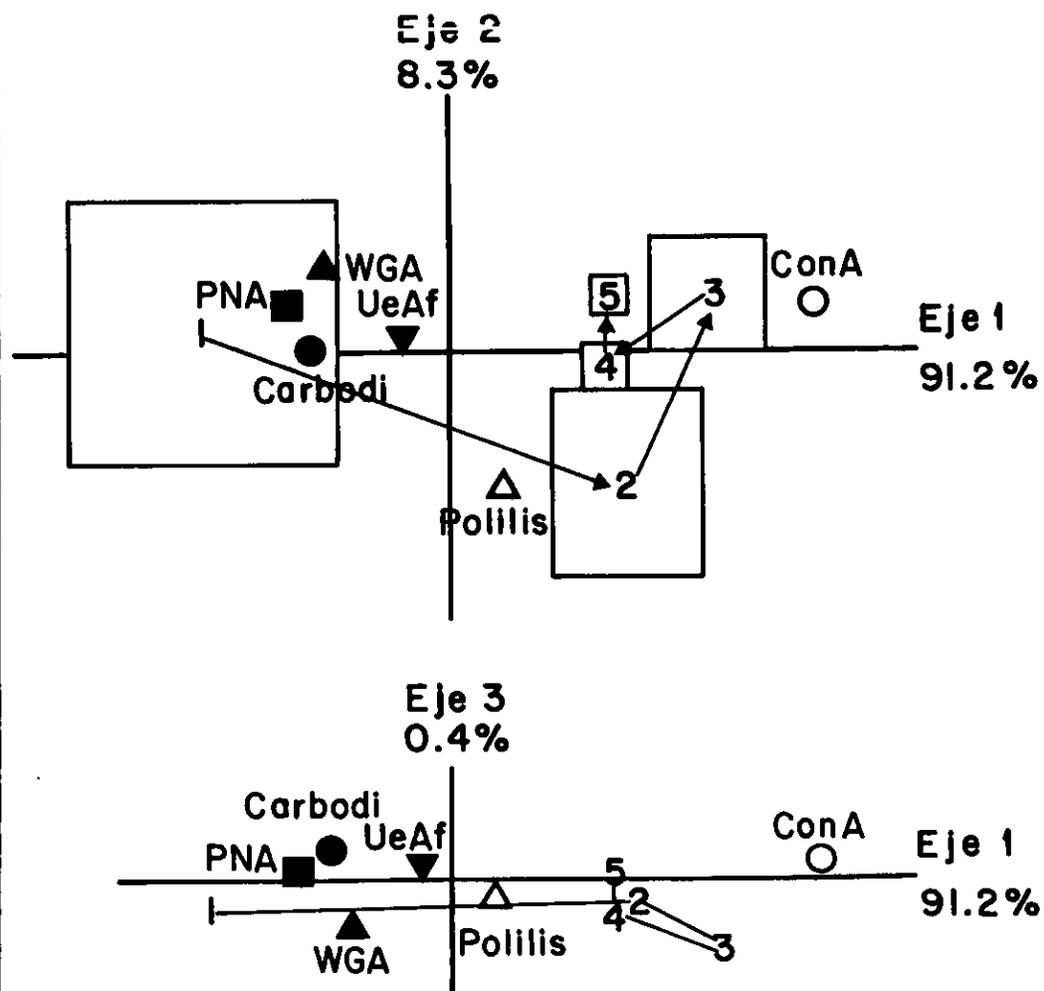
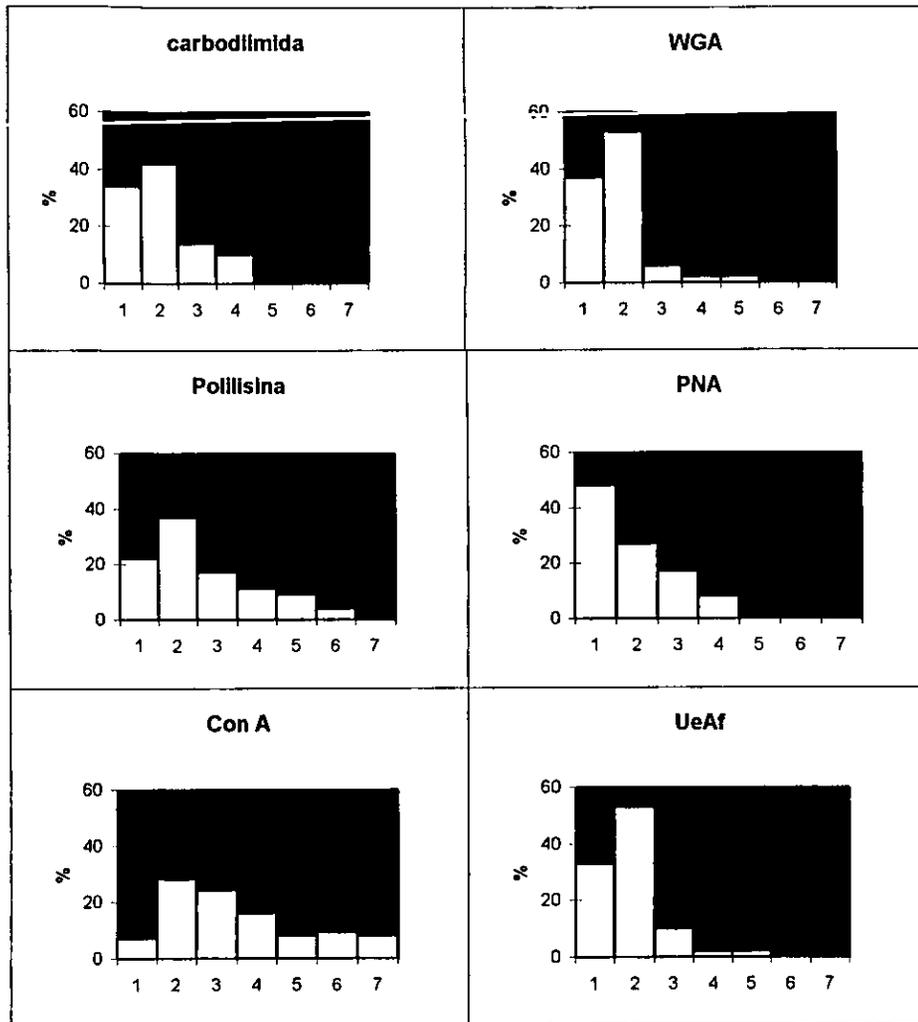


Figura 18 - Análisis factorial de correspondencias del número de bifurcaciones (Nb) e histogramas de distribución de frecuencias del Nb.



CLASE	Intervalo
1	0-100
2	100-200
3	200-300
4	300-400
5	400-500
6	500-600
7	600-700

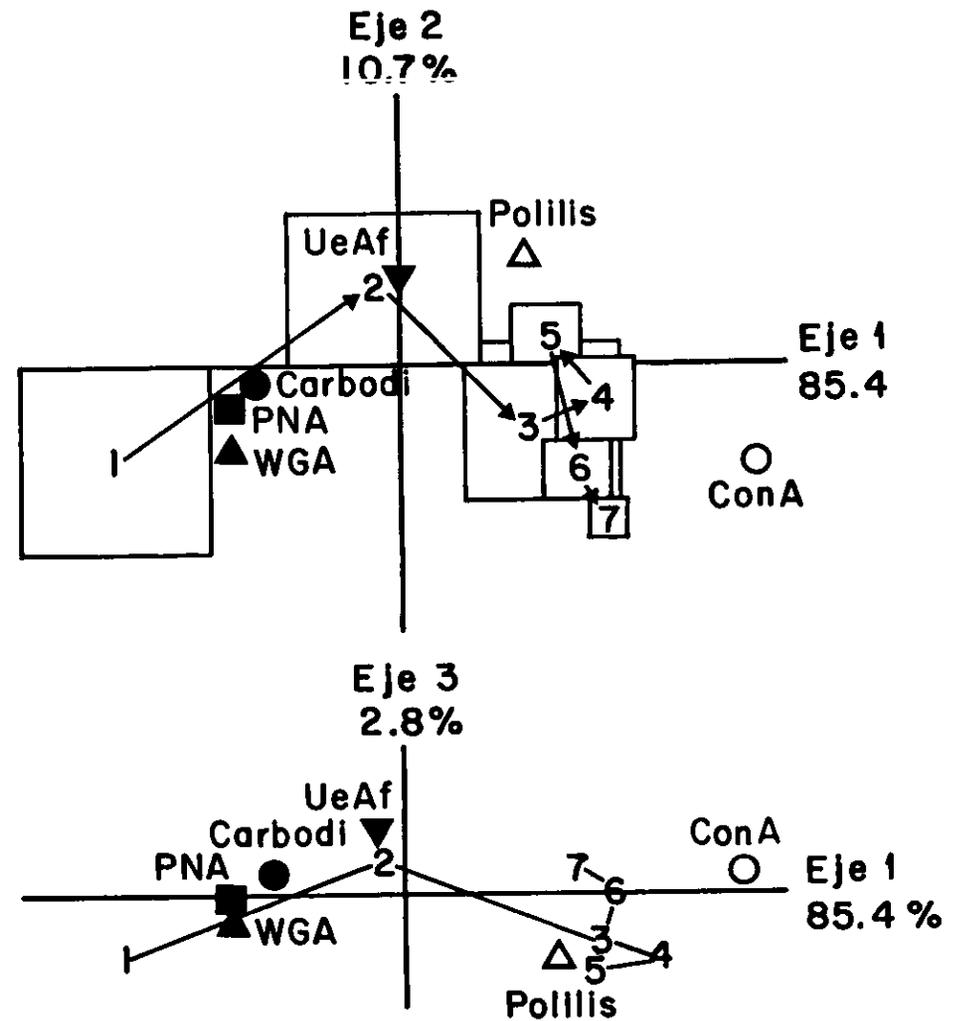


Figura 19 - Análisis factorial de correspondencias de la longitud total de las neuritas (Ln) e histogramas de distribución de frecuencias de la Ln.

5. Análisis en componente principales (ACP)

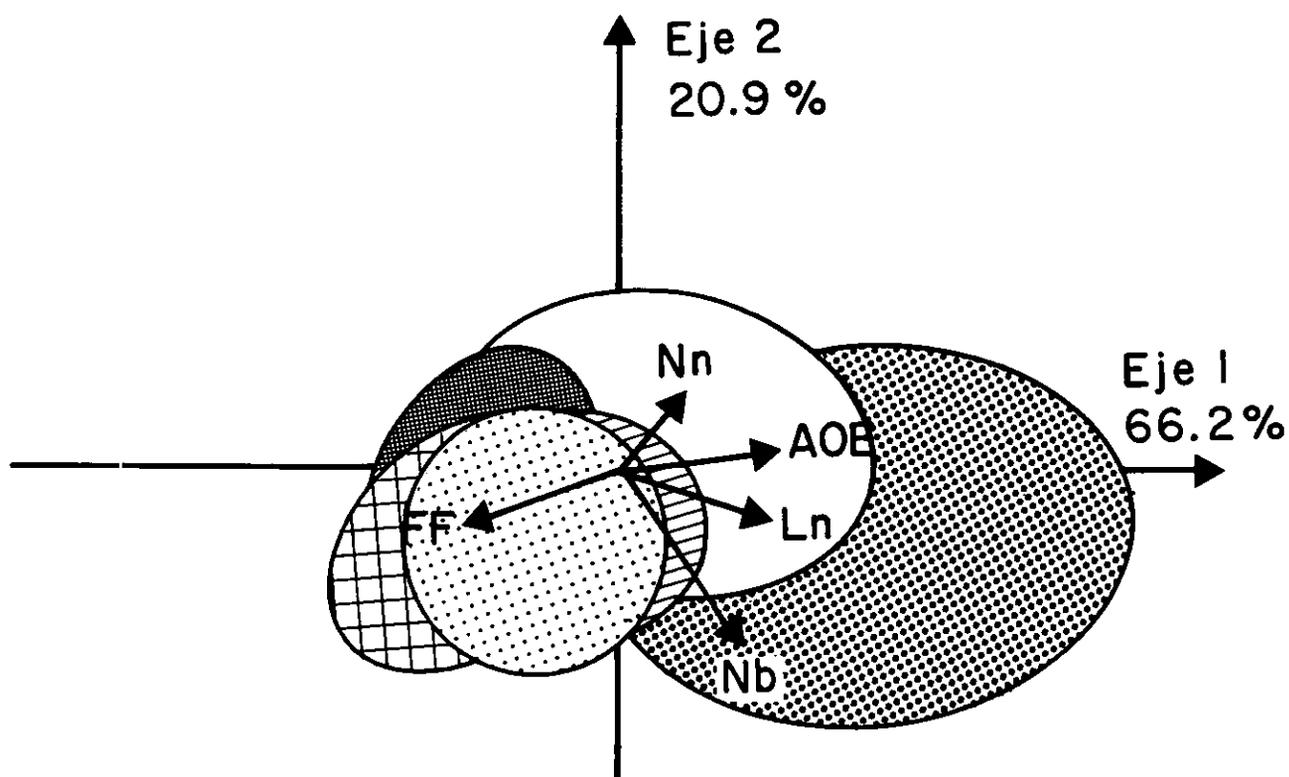
Para este análisis se seleccionó sólo 5 parámetros. De los 6 substratos estudiados se seleccionaron al azar el mismo número de efectivos (40). La Figura 20 representa el primer plano factorial que concentra 87.1% de la información total. Tres parámetros (AOE, FF y Ln) se localizan en la periferia del eje 1 (66.2% de la información) y los parámetros neuríticos (Nn y Nb) se acercan más al eje 2 (20.9% de la información).

De una forma general, las elipses que reúnen al total de las poblaciones de cada substrato, se sobreponen más o menos entre ellas. Esto significa que existen ciertas formas neuronales para cada substrato y que ciertas de esas formas son comunes a varios substratos y que otras son claramente distintas. Las principales conclusiones de este ACP son:

- La elipse de concentración correspondiente a la población cultivada sobre la lectina Con A se sitúa en la parte derecha de la gráfica, es decir, donde se localizan igualmente los 3 vectores de los parámetros: AOE, Ln y Nb (orientados positivamente). Esto significa que sobre un substrato de Con A las neuronas ocupan una mayor superficie, forman más bifurcaciones de sus neuritas y estas tienen una longitud total mayor.
- Por otro lado las células cultivadas sobre las lectinas WGA, PNA y UeAf, así como sobre la carbodiimida, presentan elipses que se sitúan en la parte izquierda de la gráfica. Es decir, estas neuronas ocupan menos superficie y sus neuritas son más cortas y menos bifurcadas. Además, en el caso de la WGA ésta también tiene menos número de neuritas por célula.
- Respecto a la población perteneciente a la polilisina, cuya elipse de concentración se localiza en posición central, muestra claramente que su forma celular es intermedia de las 2 anteriormente descritas.

Todas estas observaciones confirman los resultados obtenidos en las secciones anteriores y especialmente en los resultados de los AFC's.

En conclusión, el análisis cuantitativo del crecimiento neuronal de cultivos de neuronas disociadas sobre diferentes substratos nos muestra que estos pueden ser clasificados en 3 grupos. La carbodiimida y las lectinas WGA, PNA y UeAf forman el primer grupo, como substratos poco favorables en el crecimiento neuronal. En el segundo grupo, representado por la polilisina, substrato adecuado al desarrollo neuronal *in vitro*. Por último, la Con A podemos clasificarla como un substrato que estimula el crecimiento de neuronas disociadas de la cadena ganglionar dorsal de embrión de pollo.



Parámetros

AOE: Área

FF: Factor de forma

Nn: Número de neuritas

Nb: Número de bifurcaciones

Ln: Longitud total de neuritas.

Substratos:

□ Polilisina

▤ WGA

▣ Con A

▨ UeA-f

▧ PNA

■ Carbodimida

Figura 20 - Gráfica del análisis en componentes principales obtenido de seis substratos de cultivo y cinco parámetros neuronales. Agrupación del 87.1 % de los datos en el primer plano factorial.

III).- EFECTO DE LAS SOLUCIONES DE LECTINAS SOBRE LA FORMA NEURONAL.

Las modificaciones inducidas por la aplicación de lectinas al medio de cultivo fueron observadas tanto en explantes ganglionares como en células disociadas. En estas últimas se realizaron los análisis cuantitativos.

A). EXPLANTES GANGLIONARES.

Los explantes nerviosos se cultivaron durante 24 horas en medio control (sin lectinas) sobre un substrato de polilisina. Al final de este periodo, un halo de fibras nerviosas se observa alrededor del explante, entonces el medio de cultivo se cambia por medio que contiene la lectina a estudiar a la concentración determinada. Los resultados obtenidos para cada lectina son:

Solución de Con A (Figura 21). Después de 24 horas de incubación con 5 $\mu\text{g/ml}$ de Con A (A2) las fibras nerviosas son más largas y finas que inmediatamente después de haber agregado la lectina (A1). Así, las neuritas continúan creciendo, pero este crecimiento se ve modificado. Esto es la red de neuritas observada es irregular y contorneada. Las fibras nerviosas presentan conos de crecimiento agrandados y aplanados (flecha) y las células gliales permanecen sin desplazarse mucho de la periferia del explante.

Cuando se agregó 25 $\mu\text{g/ml}$ de Con A (B2) las neuritas se adelgazan notablemente a todo lo largo de la prolongación y sus conos de crecimiento son globulosos. Las células de tipo no neural se retraen y en algunos casos mueren.

En resumen, la lectina Con A aplicada en solución sobre los explantes nerviosos afecta el crecimiento de las neuritas y de las células gliales. Estas modificaciones son dependientes de la concentración utilizada, así a bajas concentraciones (5 $\mu\text{g/ml}$) el crecimiento neurítico es estimulado, mientras que a altas dosis (25 $\mu\text{g/ml}$) se inhibe el crecimiento.

Solución de WGA (Figura 22). La incubación de explantes nerviosos con 5 $\mu\text{g/ml}$ de WGA (A2) es fatal para las células de tipo no neural, las cuales rápidamente se vuelven necróticas. La mayor parte de las fibras nerviosas desaparecen y las pocas neuritas que sobreviven a 24 horas de exposición de la lectina presentan una forma de rosario, con varicosidades a lo largo de todo el proceso neurítico.

Cuando se agregó 25 $\mu\text{g/ml}$ de WGA la mayoría de los explantes ganglionares se despegaron del substrato después de 24 horas de exposición a la solución de la lectina.

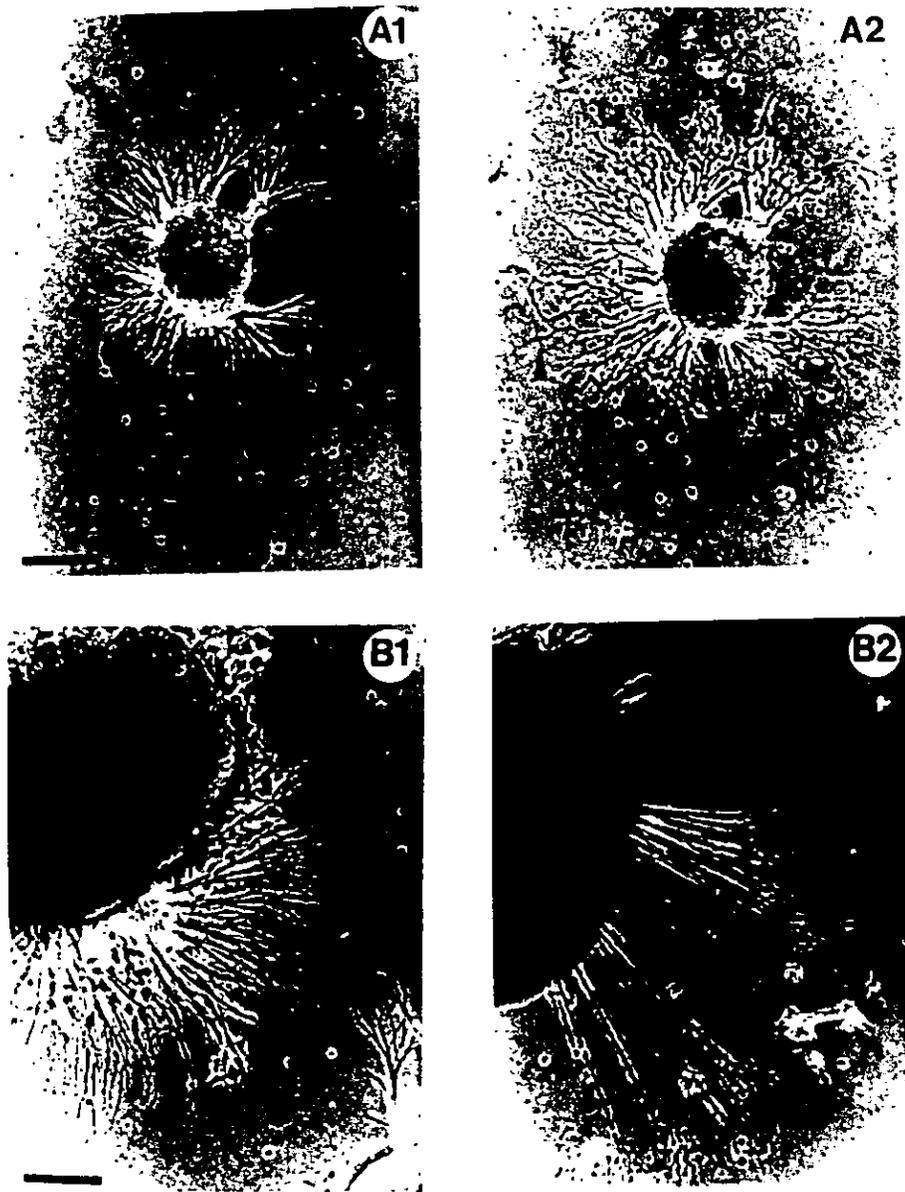


Figura 22 - Microfotografías de explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados en presencia de la lectina Con A en el medio de cultivo.

A1 y B1 - Explantes ganglionares cultivados sobre un substrato de poliilisina y medio de cultivo normal durante 24 horas.

A2 - Mismo explante ganglionar que A1, después de 24 horas en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Con A en el medio de cultivo. El crecimiento de fibras nerviosas en presencia de la lectina es muy irregular y se observan conos de crecimiento aplanados (flecha). Escala = 20 μm .

B2 - Mismo explante ganglionar que B1, después de 24 horas en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de Con A en el medio de cultivo. Las fibras nerviosas en estas concentraciones presentan un crecimiento recto en una primera parte y después se bifurcan con un crecimiento irregular. Escala = 50 μm .

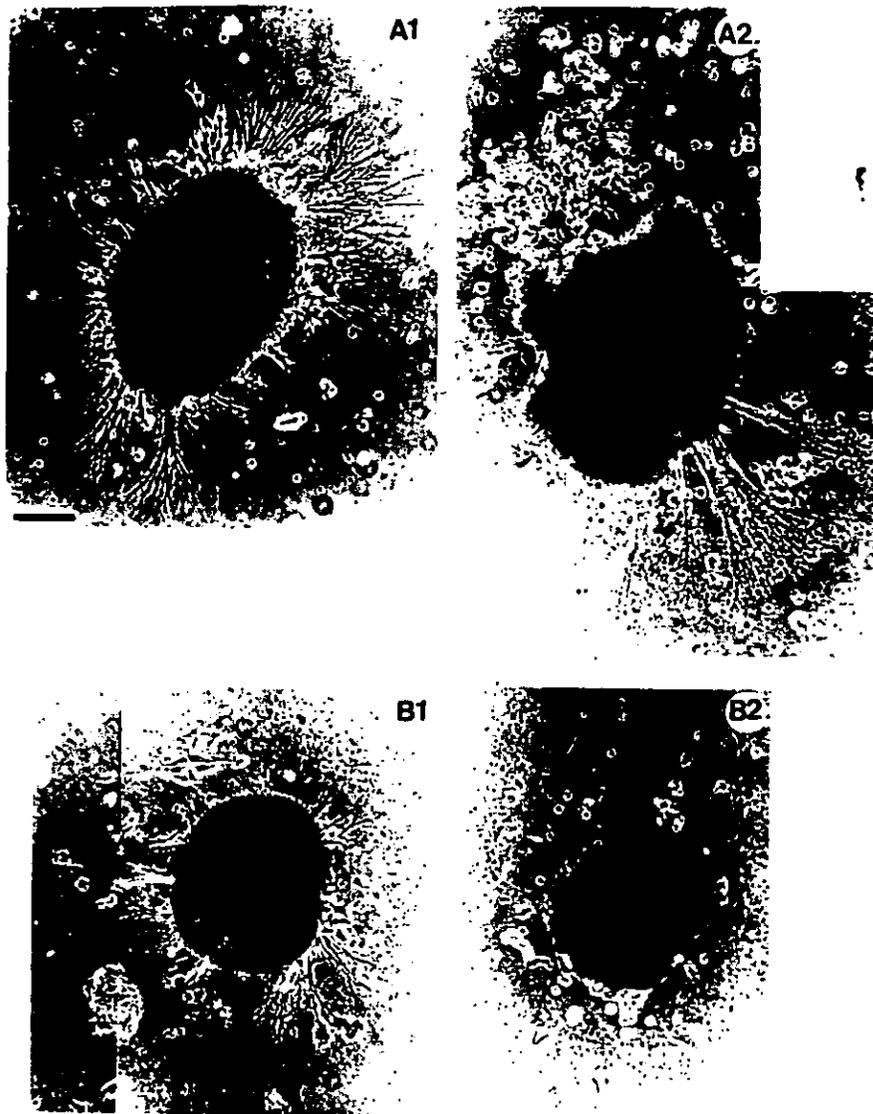


Figura 23 - Microfotografías de explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados en presencia de la lectina WGA en el medio de cultivo.

A1 y B1 - Explantes ganglionares cultivados sobre un substrato de polilisina y medio de cultivo normal durante 24 horas.

A2 - Mismo explante ganglionar que A1, después de 24 horas en presencia de 5 µg/ml de WGA en el medio de cultivo. Sólo algunas fibras nerviosas continúan creciendo en presencia de la lectina, pero su forma es muy irregular y agrupadas entre ellas. Las células no nerviosas presentan necrosis.

B2 - Mismo explante ganglionar que B1, después de 24 horas en presencia de 25 µg/ml de WGA en el medio de cultivo. Las fibras nerviosas así como las células gliales mueren a esta concentración de la lectina.

Escala = 50 µm.

Estos resultados muestran que la WGA a ambas concentraciones utilizadas, provoca toxicidad dosis-dependiente a los explantes ganglionares de la cadena dorsal de embrión de pollo en cultivo.

Solución de PNA (Figura 23). La solución de PNA (5 $\mu\text{g/ml}$) modifica el crecimiento neuronal. La red de fibras nerviosas continúan creciendo alrededor del explante, sólo que presentan entre ellas numerosas interconexiones. A partir de cierta distancia solo algunas neuritas continúan su crecimiento en forma aislada. Sin embargo, esas fibras individualizadas son muy delgadas (A2) y/o con conos de crecimiento muy prominentes (B2). Las células de tipo glial son muy escasas.

Solución de UeAf (Figura 24). La exposición de una solución de UeAf (5 y 25 $\mu\text{g/ml}$) parece no provocar ninguna modificación en el crecimiento neuronal de los explantes ganglionares. Las fibras nerviosas observadas 24 horas después de la adición de la lectina son alargadas y aisladas, similar a la de los cultivos control (Figura 6).

Las células gliales son poco numerosas en presencia de una solución 5 $\mu\text{g/ml}$ de UeAf y se vuelven refrigerantes y globulosas a la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$.

En conclusión, el efecto de las soluciones de lectinas cuando sobre el crecimiento de los explantes ganglionares en cultivo es muy variable. Este efecto depende de diversos factores, tipo de lectina, concentración y momento de su aplicación:

- El efecto de la lectina PNA en solución, no parece variar en función de la concentración utilizada, al menos en este estudio a las dos concentraciones utilizadas ejerce el mismo efecto sobre el crecimiento neuronal. La solución de lectina UeAf, no modifica el crecimiento de los explantes ganglionares de embrión de pollo.
- En cambio, para las otras lectinas estudiadas, observamos una dependencia de la dosis utilizada. La solución de WGA se observó que a mayor concentración mayor efecto tóxico. Para la solución de Con A encontramos que a bajas dosis se favorece el crecimiento pero se vuelve tóxica a dosis mayores.

B).- ANALISIS CUANTITATIVO SOBRE NEURONAS DISOCIADAS.

Este estudio se realizó con 4 lectinas que presentan especificidades monosacáridas diferentes. La inhibición específica con azúcares exógenas, también fue analizada y los resultados obtenidos se resumen a continuación lectina por lectina.

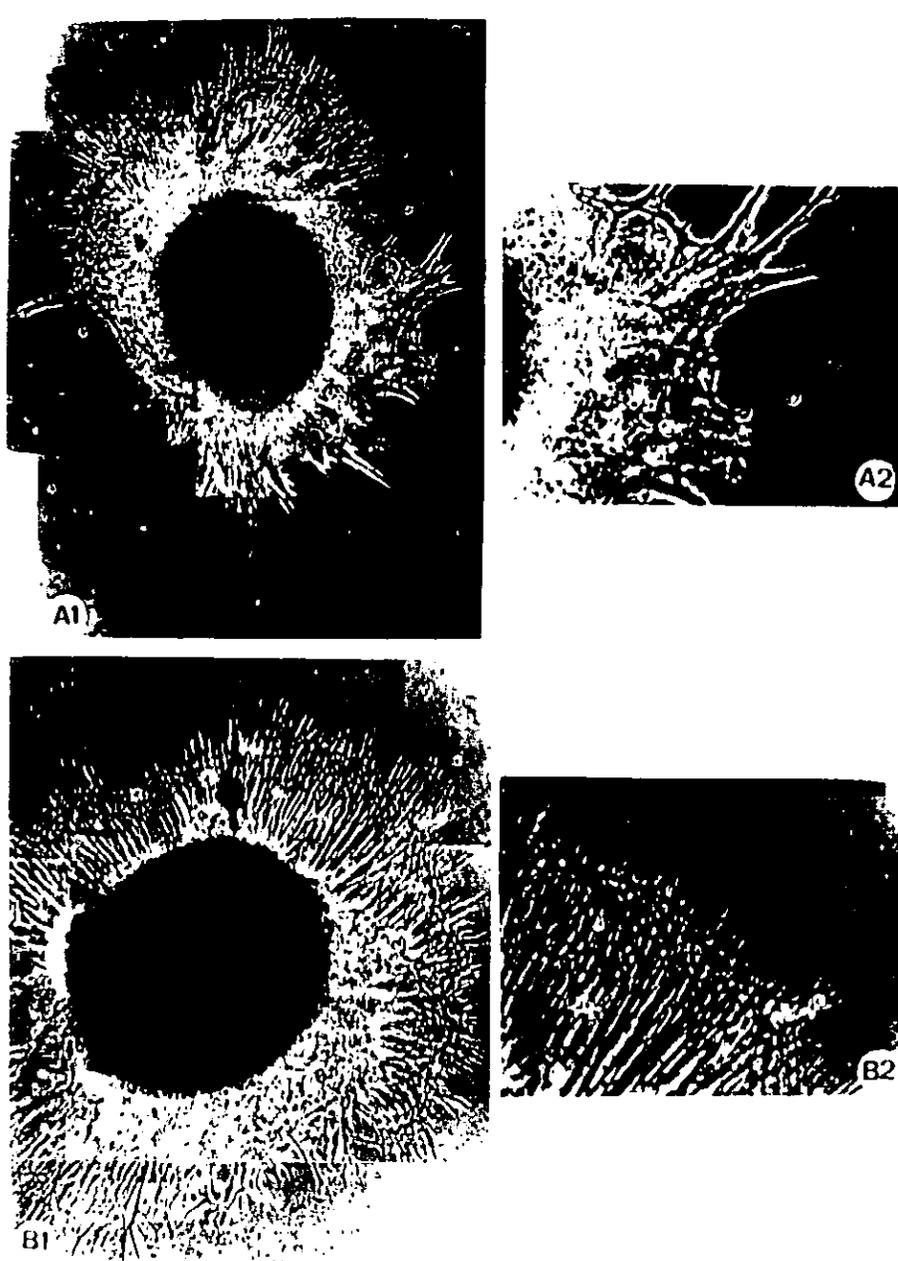


Figura 24 - Microfotografías de explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados en presencia de la lectina PNA en el medio de cultivo. Los explantes ganglionares fueron cultivados sobre un sustrato de polilisina y medio de cultivo normal durante 24 horas.

A1 y A2 - Explante ganglionar después de 24 horas en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de PNA en el medio de cultivo. Las fibras nerviosas presentan un crecimiento simétrico y prominente alrededor del explante. Las fibras se acompañan con células gliales fuera del explante, pero a cierta distancia estas últimas crecen individualmente (flecha A2).

B1 y B2 - Explante ganglionar después de 24 horas en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de PNA en el medio de cultivo. El crecimiento de las fibras nerviosas en presencia de esta concentración de lectina es muy similar a 5 $\mu\text{g/ml}$ (A1). Las fibras individuales frecuentemente muestran conos de crecimiento aplanados sin filopodios (B2).

Escala A1 y B1 = 50 μm , A2 y B2 = 20 μm .

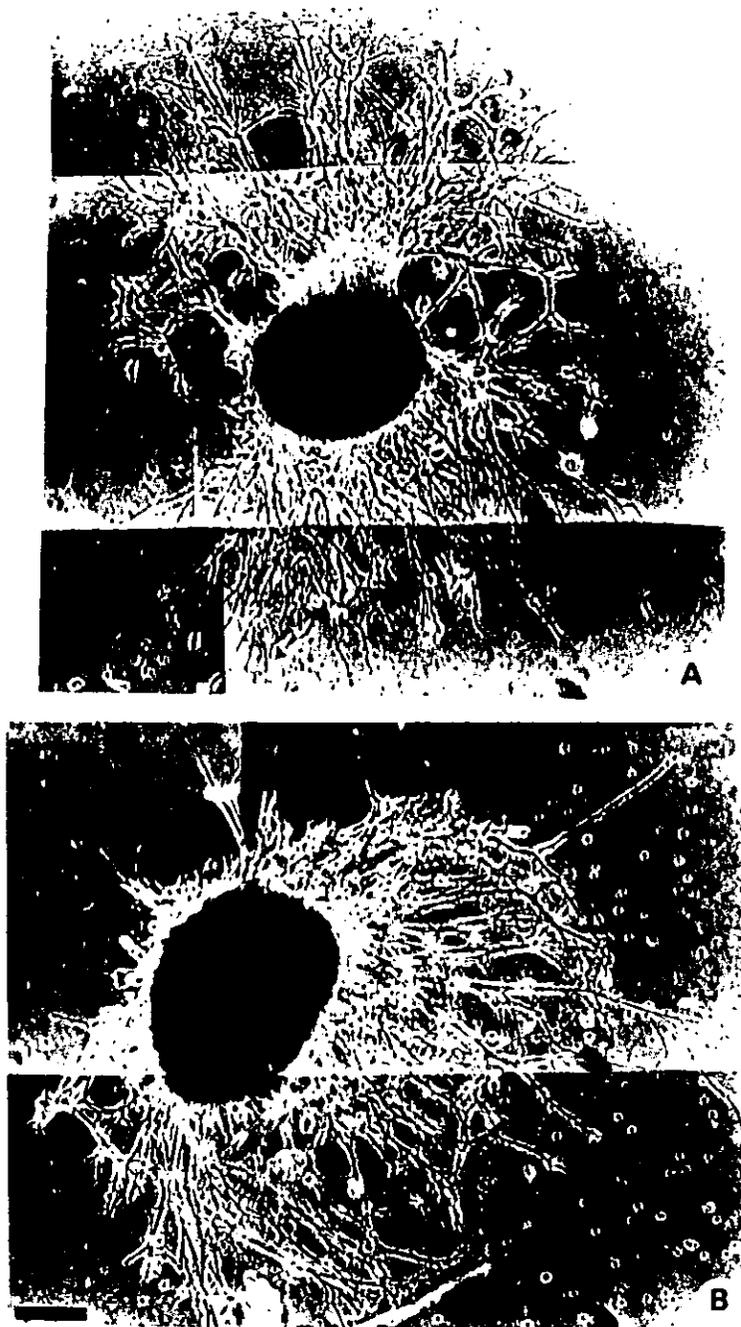


Figura 25 - Microfotografías de explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados en presencia de la lectina UeAf en el medio de cultivo. Los explantes ganglionares fueron cultivados sobre un sustrato de polilisina y medio de cultivo normal durante 24 horas.

A - Explante ganglionar después de 24 horas en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de UeAf en el medio de cultivo.

B - Explante ganglionar después de 24 horas en presencia de 25 $\mu\text{g/ml}$ de UeAf en el medio de cultivo.

En ambos casos se observa un notable crecimiento de fibras nerviosas aisladas y escasas células gliales alrededor de los explantes

Escala = 50 μm .

TABLA VII.- PROMEDIOS Y ERRORES ESTÁNDARES A LA MEDIA DE 7 PARÁMETROS MORFOLÓGICOS OBTENIDOS DE CULTIVOS DE NEURONAS DISOCIADAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA LECTINA Con A

Sustrato (concentración)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Con A (50 µg/ml)	Con A (50 mg/ml)
medio	M1	M1 + Con A (0.25 µg/ml)	M1 + Con A (1 µg/ml)	M1+ Con A (5 µg/ml)	M1 + Con A (25 µg/ml)	M1	M1+mannosa 100 mM
	n=280	n=142	n=142	n=140	n=140	n=278	n=147
Ocupación espacial (O.E.)							
Área (AOE) (µm ²) ± EEM	11560.23 ±681.41	12878.27 ±696.08	18675.63 ±1290.91	16058.82 ±1190.48	9429.50 ±477.96	15902.64 ±949.19	8680.64 ±655.08
Perímetro (POE) (µm) ± EEM	613.28 ±32.75	665.03 ±35.38	1041.35 ±69.69	898.52 ±70.95	520.90 ±34.36	827.68 ±93.73	486.33 ±31.75
Factor de Forma (FF) ± EEM	437.76 ± 18.61	378.76 ±25.05	265.24 ±19.32	311.62 ±22.32	448.97 ±20.05	358.22 ±16.61	499.11 ±18.17
Forma Global (FG) ± EEM	0.39 ±0.02	0.40 ±0.03	0.37 ±0.03	0.36 ±0.04	0.24 ±0.03	0.43 ±0.03	0.25 ±0.02
Número de neuritas (Nn) ± EEM	1.40 ±0.06	1.31 ±0.09	1.38 ±0.09	1.52 ±0.10	1.10 ±0.06	1.31 ±0.06	1.23 ±0.06
Número de bifurcaciones de las neuritas (Nb) ± EEM	0.56 ±0.08	0.45 ±0.10	1.05 ±0.17	0.62 ±0.13	0.24 ±0.06	1.22 ±0.12	0.19 ±0.07
Longitud total de las neuritas (Ln) (µm) ± EEM	234.82 ±24.33	283.31 ±23.54	382.19 ±31.55	308.86 ±27.13	153.22 ±11.99	339.16 ±25.30	50.77 ±14.64

M1, medio 199 + 5% FCS
n, número de células analizadas

Solución de Con A. Las concentraciones de lectina que se agregaron a los cultivos después de 4 horas *in vitro* fueron 0.25, 1, 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$.

1. Medias y errores estándares.

La Tabla VII muestra los valores del promedio y del error standard de la media para los siete parámetros estudiados y se resumen así:

- La solución de Con A altera todos los parámetros estudiados. Esta modificación depende de la concentración de la lectina utilizada. El efecto máximo se obtuvo a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.
- La concentración de 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de Con A, que corresponde a la cantidad de lectina que se libera en el medio de cultivo (ver primera parte de resultados) también modifica el crecimiento neuronal. Sin embargo, ésta modificación es intermedia entre la obtenida con el grupo control (polilisina) y el grupo Con A-substrato.
- A altas concentraciones (25 $\mu\text{g/ml}$) la Con A en solución es tóxica para las neuronas sensoriales.
- Cuando se utiliza la Con A como substrato de cultivo, los valores promedio de los parámetros son también modificados, pero de diferente forma que en los grupos Con A-solución. El parámetro discriminante para el grupo Con A-substrato es definitivamente Nb.
- La adición de 100 mM de manopiranosida a cultivos realizados sobre un substrato de Con A provoca una disminución en todos los parámetros estudiados. Estos valores son menores que los obtenidos en el grupo control (polilisina).

2. Comparación de varianzas y medias.

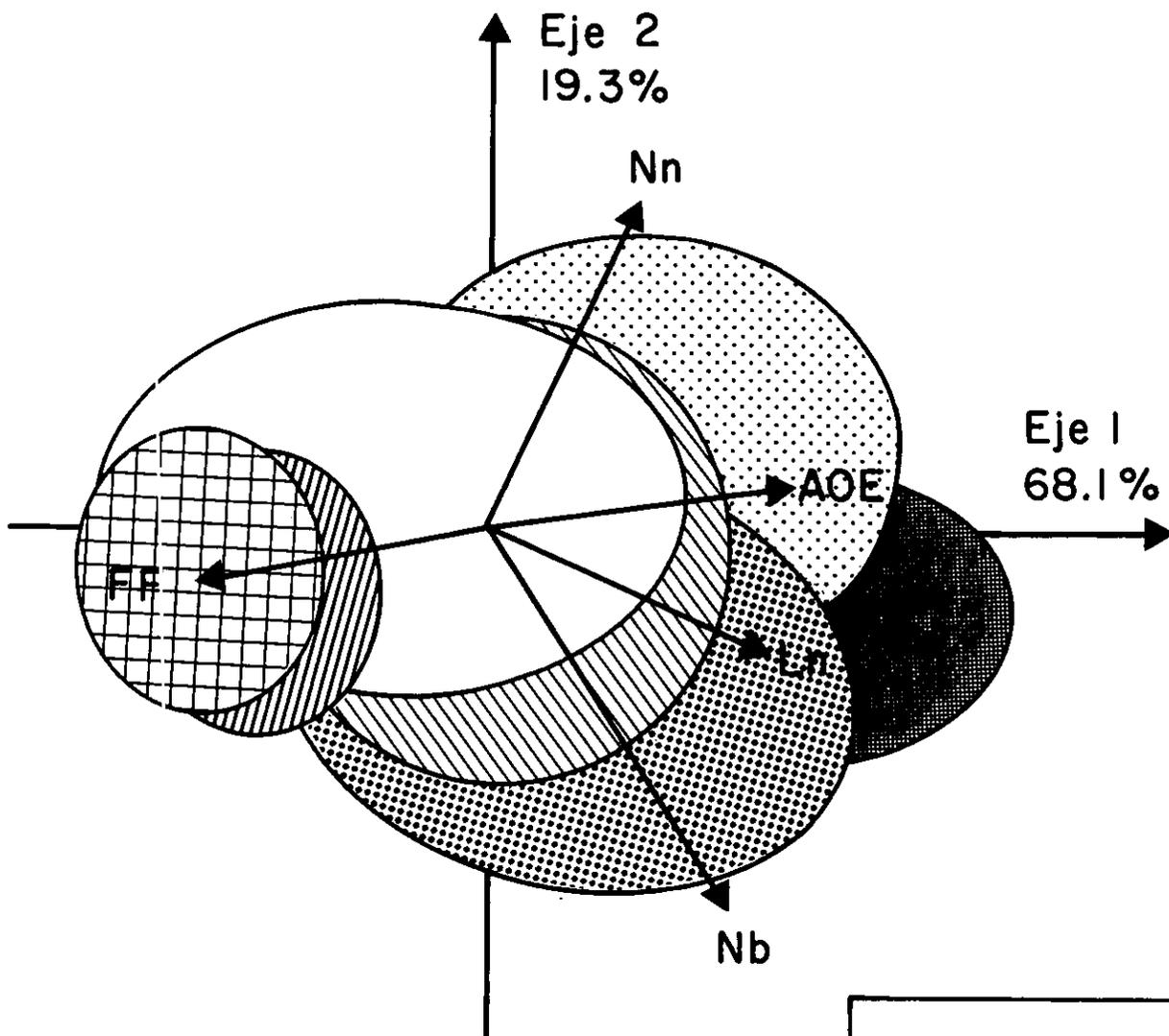
A partir de los resultados obtenidos por la comparación de medias y varianzas se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Análisis entre grupos experimentales.

La polilisina es diferente significativamente del grupo azúcar inhibitoria y de las poblaciones de Con A en solución a concentraciones 1, 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$ para 3 de los parámetros de ocupación espacial ($p < 0.01$) y para Ln y Nb ($F = 3.71$, $p < 0.01$). Sin embargo, no hay diferencias significativas ($F = 1.03$) con respecto a la menor concentración de lectina utilizada (0.25 $\mu\text{g/ml}$).

Igualmente no se observan diferencias significativas entre el grupo Con A-substrato y los grupos en solución 0.25, 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ para la mayoría de los parámetros, excepto para el parámetro Nb ($F = 2.67$, $p < 0.05$). La máxima concentración de Con A probada (25 $\mu\text{g/ml}$) presenta diferencias significativas con todos los otros grupos experimentales al ser una concentración tóxica ($p < 0.01$).

La Con A-substrato es significativamente diferente del grupo azúcar para todos los parámetros ($p < 0.01$), excepto para FG ($F = 1.31$) y Nn ($F = 1.03$). El



Parámetros:
 AOE: Área
 FF: Factor de forma
 Nn: Número de neuritas
 Nb: Número de bifurcaciones
 Ln: Longitud total de neuritas.

- Polilisina
- ▨ 0.25 μg/ml
- 1 μg/ml
- ▩ 5 μg/ml
- ▧ 25 μg/ml
- ▤ ConA substrato
- ▥ manosa

Figura 25 - Gráfica del análisis en componentes principales obtenido del grupo experimental Con A y cinco parámetros neuronales. Agrupación del 87.4 % de los datos en el primer plano factorial.

FALTAN PAGINAS

De la: 58

A la: 59

grupo Con A 25 $\mu\text{g/ml}$ es diferente significativamente del grupo control y del grupo Con A-substrato para todos los parámetros ($p < 0.01$).

Análisis parámetro versus parámetro.

Este análisis muestra el poder discriminante de algunos parámetros. A partir de él se clasificaron como parámetros discriminantes a AOE, POE, FF, Ln y Nb. Los otros 2 parámetros (Nb y FG) no muestran más que muy pequeña variación y no pueden considerarse como buenos parámetros discriminantes.

3. Análisis en Componentes Principales.

La Figura 25 representa la proyección en el primer plano factorial, la cual concentra 87.4% de la información total. Los vectores de proyección de 5 parámetros analizados se localizan más o menos en las mismas posiciones que en el ACP que se realizó para el estudio del efecto de diversos substratos (Figura 20). A pesar de que en este caso también hay sobreposición de elipses, podemos observar los siguientes resultados:

- Las elipses correspondientes a las concentraciones 0.25, 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de solución de Con A están situadas a la derecha de la elipse de polilisina. Esto quiere decir que la mayoría de las neuronas de esas poblaciones poseen una mayor área de ocupación espacial y tienen mayor número de bifurcaciones y neuritas más largas que aquellas cultivadas sobre polilisina. Estas modificaciones de la forma neuronal son dependientes de la concentración utilizada y llegan a ser máximas a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$.
- La elipse de la población de Con A-substrato contiene en gran parte a las elipses correspondientes a las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de lectina en solución, pero ésta se sitúa más bien en la parte inferior de la gráfica, es decir, donde influye con mayor peso el vector Nb.
- Existe cierta sobreposición entre las elipses correspondientes a 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de lectina en solución y de Con A-substrato. Sin embargo, debido al desplazamiento de la elipse correspondiente a la población de Con A-substrato hacia el parámetro Nb, ésta puede ser considerada como una población diferente.
- En la parte izquierda de la gráfica se localizan las elipses correspondientes a las poblaciones cultivadas en presencia de azúcar inhibitoria (manopiranosida) y de una solución de Con A 25 $\mu\text{g/ml}$. Esta localización nos indica que las neuronas provenientes de estas poblaciones ocupan un reducido espacio y poseen pocas bifurcaciones y así como pequeñas neuritas. Es decir, la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de Con A en solución inhibe el crecimiento neuronal de forma similar a la manopiranosida (100 mM) la cual inhibe selectivamente el efecto de un substrato de Con A.

En conclusión, el crecimiento de las neuronas sensoriales de embrión de pollo se modifica por la presencia en solución de la lectina Con A. Estas modificaciones son dosis dependientes y específicas de los grupos manosídicos en la superficie celular. A bajas concentraciones, la forma neuronal es menos

TABLA VIII- PROMEDIOS Y ERRORES ESTÁNDARES A LA MEDIA DE 7 PARÁMETROS MORFOLÓGICOS OBTENIDOS DE CULTIVOS DE NEURONAS DISOCIADAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA LECTINA WGA

Sustrato (concentración)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	WGA (50 µg/ml)	WGA (50 mg/ml)
medio	M1	M1 + WGA (0.25 µg/ml)	M1 + WGA (5 µg/ml)	M1+WGA (25 µg/ml)	M1	M1+glucosamina (300 nM)
	n=280	n=131	n=132	n=124	n=244	n=142
Ocupación espacial (O.E.)						
Área (AOE) (µm ²) ± EEM	11560.23 ±681.41	11308.04 ±781.84	10099.93 ±838.79	7275.80 ±752.59	8744.62 ±540.79	7711.40 ±387.32
Perímetro (POE) (µm) ± EEM	613.28 ±32.75	641.32 ±40.71	578.09 ±248.68	438.08 ±37.47	483.21 ±27.35	429.08 ±17.78
Factor de Forma (FF) ± EEM	437.76 ± 18.61	376.08 ±2012	431.66 ±22.60	515.45 ±28.16	508.79 ±18.73	544.04 ±15.42
Forma Global (FG) ± EEM	0.39 ±0.02	0.34 ±0.03	0.24 ±0.02	0.31 ±0.04	0.29 ±0.02	0.29 ±0.02
Número de neuritas (Nn) ± EEM	1.40 ±0.06	1.21 ±0.09	1.31 ±0.09	1.29 ±0.11	1.11 ±0.06	1.17 ±0.06
Número de bifurcaciones de las neuritas (Nb) ± EEM	0.56 ±0.08	0.50 ±0.10	0.25 ±0.09	0.23 ±0.10	0.23 ±0.08	0.15 ±0.06
Longitud total de las neuritas (Ln) (µm) ± EEM	234.82 ±24.33	212.96 ±16.87	177.87 ±23.11	132.53 ±17.98	134.10 ±11.91	119.03 ±6.57

M1, medio 199 + 5% FCS
n, número de células analizadas.

FALTAN PAGINAS

De la: 63

A la: 64

regular y con neuritas más largas y más bifurcadas. El efecto es máximo a 1 $\mu\text{g/ml}$ de solución de Con A. En cambio a medida que se aumenta la concentración el cambio se revierte hasta inhibir el crecimiento neuronal a dosis de 25 $\mu\text{g/ml}$.

Solución de WGA. Las concentraciones de la lectina WGA utilizadas después de 4 horas de cultivo fueron 0.25, 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$.

1. Promedios y errores estándares.

Los valores de promedios y errores estándares obtenidos de los 7 parámetros estudiados se presentan en la Tabla VIII. Las principales conclusiones son:

- La WGA en solución modifica negativamente el crecimiento neuronal disminuyendo los parámetros topológicos y neuríticos. Estas alteraciones en el crecimiento neuronal son proporcionales a la concentración utilizada.
- La adición de 300 mM de glucosamina a los cultivos realizados sobre sustratos de WGA no parece modificar los valores promedios de los parámetros morfométricos estudiados.

2. Comparación de varianzas y medias (Tabla VIII).

Este estudio mostró que los parámetros FG y Nb no son significativamente diferentes (discriminantes) para permitirnos describir el efecto de esta lectina en solución, por lo cual no serán considerados en el siguiente análisis.

Análisis entre grupos experimentales.

Todas las concentraciones de la lectina WGA utilizadas, muestran valores promedio de los parámetros de ocupación espacial significativamente diferentes de aquellos que se obtuvieron sobre un sustrato de polilisina ($p < 0.01$). El único parámetro que no difiere significativamente es el correspondiente a Nn ($F = 1.25$).

Los valores obtenidos para las concentraciones 0.25 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de WGA en solución son significativamente diferentes de los del grupo WGA-sustrato para todos los parámetros discriminantes ($p < 0.01$). La única diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo WGA-sustrato y el grupo 25 $\mu\text{g/ml}$ de WGA en solución se refiere al parámetro Nn.

El grupo de azúcar inhibitoria (glucosamina) es diferente significativamente del grupo polilisina ($p < 0.01$), pero en cambio no lo es del grupo WGA-sustrato para ninguno de los parámetros discriminantes ($F = 1.02$).

3. Análisis en Componentes Principales.

La Figura 26 concentra 85.9% de la información total obtenida para el conjunto de las poblaciones. El plano factorial se representó con los 2 primeros ejes factoriales (concentrando 64 y 21.9% de la información respectivamente).

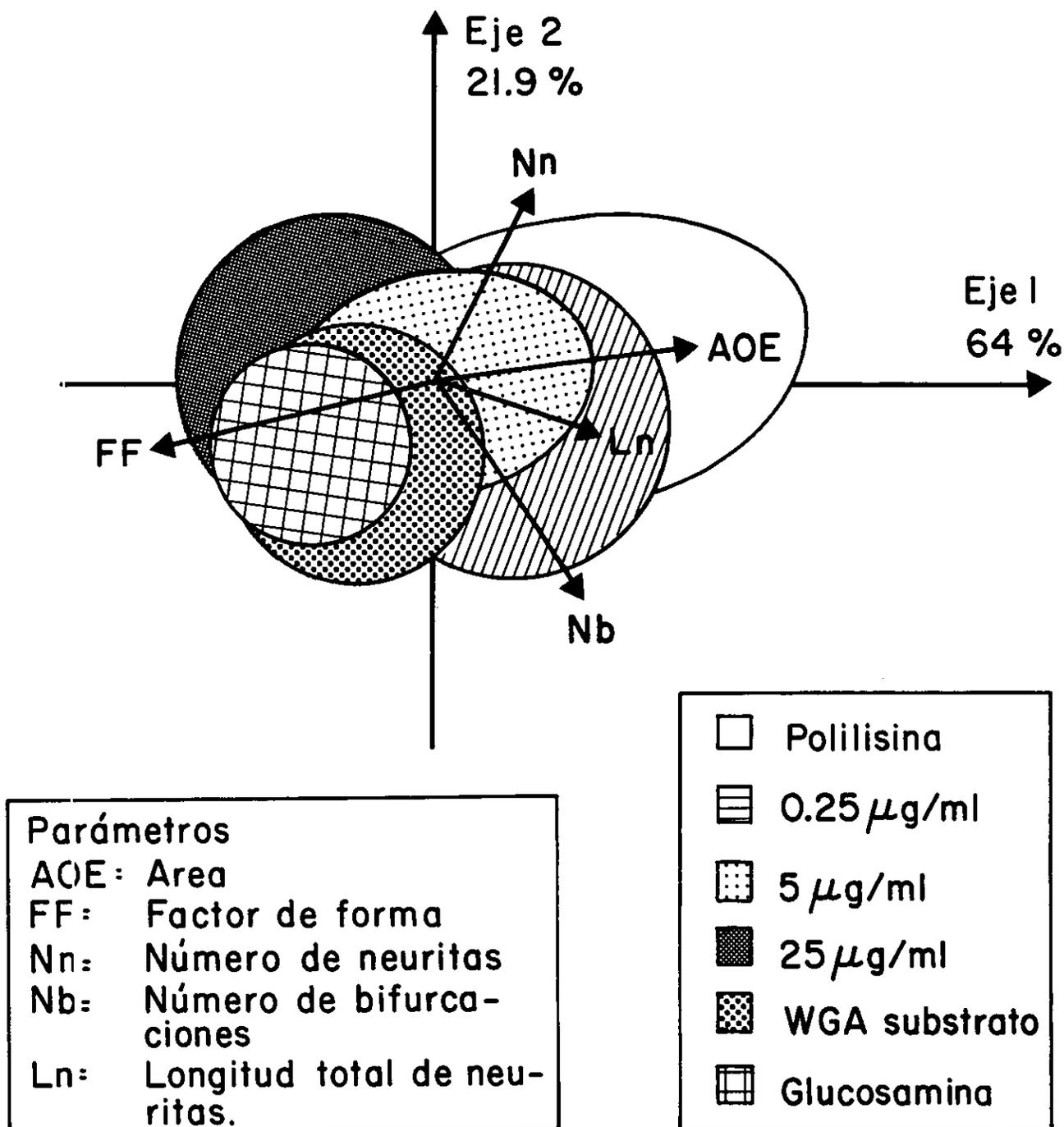


Figura 26 - Gráfica del análisis en componentes principales obtenido del grupo experimental WGA y cinco parámetros neuronales. Agrupación del 85.9 % de los datos en el primer plano factorial.

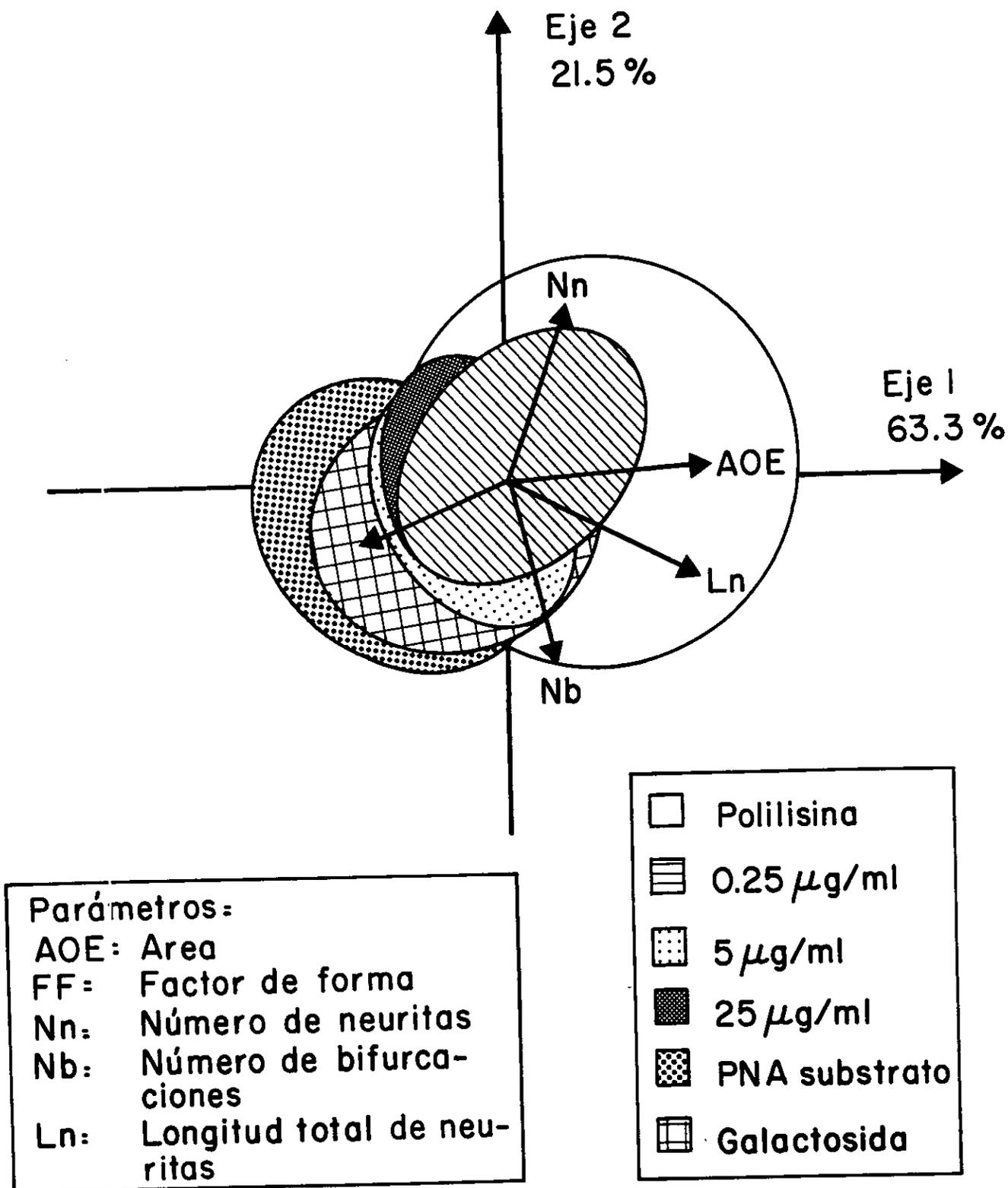


Figura 27 - Gráfica del análisis en componentes principales obtenido del grupo experimental PNA y cinco parámetros neuronales. Agrupación del 84.8 % de los datos en el primer plano factorial.

En una forma general las elipses de concentración presentan una gran intersección entre ellas. Sin embargo, ciertas diferencias son a remarcar entre los grupos experimentales.

- La elipse de concentración de la población de polilisina se localiza a la derecha de las otras elipses. Esto significa que las neuronas que crecen sobre dicho sustrato poseen una forma espacial mayor y con más largas neuritas.
- Por otro lado, la elipse poblacional correspondiente al grupo de 25 µg/ml de WGA en solución se localiza en la parte izquierda de la gráfica, lo cual significa que las células de esta población muestran un reducido crecimiento neurítico.
- La localización de la elipse del grupo glucosamina se encuentra completamente contenida en la elipse que corresponde al grupo WGA-sustrato. Esto significa que no se presentó inhibición del efecto de WGA-sustrato por la aplicación del azúcar inhibitoria ó que ambas poblaciones celulares son indistinguibles morfológicamente.

En resumen, la WGA en solución es una lectina que inhibe el crecimiento de las neuronas sensoriales de embrión de pollo en cultivo. Su efecto es similar al que se obtuvo cuando la lectina se aplicó en forma de sustrato (Fig. 7).

Los resultados obtenidos por la aplicación de un monosacárido inhibitor sobre un sustrato de WGA sugiere que la acción del sustrato no se debe únicamente a los sitios glucosaminoglicanos de la membrana neuronal.

Solución de PNA. Tres concentraciones de la lectina PNA se probaron en solución después de 4 horas de cultivo: 0.25, 5 y 25 µg/ml.

1.- Promedios y errores estándares.

La Tabla IX muestra los resultados obtenidos para los siete parámetros morfométricos estudiados, los cuales se pueden resumir como:

- La lectina PNA en solución provoca una disminución de los valores promedio de los parámetros AOE, POE, FG, Nb y Ln. El parámetro Nn no se modifica con ninguna de las concentraciones utilizadas ($F = 1.03$). La disminución del crecimiento neuronal varía poco en función de la concentración utilizada (no es estadísticamente significativo).
- El grupo del azúcar inhibitoria (galactosida) no parece inhibir el efecto negativo de la PNA-sustrato en el crecimiento neuronal ($F = 1.14$).

2.- Comparación de varianzas y medias.

Este análisis se realizó para los 7 parámetros, a pesar de que algunos de ellos tienen poco poder discriminante (Tabla IX):

- El grupo correspondiente al sustrato de polilisina es diferente de los tres grupos correspondientes a las diferentes concentraciones de solución de PNA

TABLA IX.- PROMEDIOS Y ERRORES ESTÁNDARES A LA MEDIA DE 7 PARÁMETROS MORFOLÓGICOS OBTENIDOS DE CULTIVOS DE NEURONAS DISOCIADAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA LECTINA PNA

Sustrato (concentración)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	PNA (50 µg/ml)	PNA (50 mg/ml)
medio	M1	M1 + PNA (0.25 µg/ml)	M1 + PNA (5 µg/ml)	M1+PNA (25 µg/ml)	M1	M1+galactoside (400 mM)
	n=280	n=146	n=132	n=142	n=244	n=144
Ocupación espacial (O.E.)						
Área (AOE) (µm ²)	11560.23	9724.89	8805.13	7247.45	8115.25	7637.50
± EEM	±681.41	±670.79	±582.53	±263.25	±646.15	±666.88
Perímetro (POE) (µm)	613.28	529.73	475.68	434.74	476.79	453.87
± EEM	±32.75	±31.06	±25.82	±13.80	±33.24	±34.61
Factor de Forma (FF)	437.76	474.74	509.69	496.09	503.29	518.54
± EEM	± 18.61	±24.08	±18.44	±13.77	±23.31	±21.83
Forma Global (FG)	0.39	0.27	0.28	0.30	0.34	0.32
± EEM	±0.02	±0.03	±0.03	±0.28	±0.03	±0.02
Número de neuritas (Nn)	1.40	1.30	1.05	1.23	1.25	1.29
± EEM	±0.06	±0.08	±0.04	±0.06	±0.06	±0.07
Número de bifurcaciones de las neuritas (Nb) ± EEM	0.56 ±0.08	0.28 ±0.10	0.19 ±0.08	0.25 ±0.07	0.13 ±0.05	0.07 ±0.04
Longitud total de las neuritas (Ln) (µm)	234.82	161.46	140.83	126.57	134.10	119.77
± EEM	±24.33	±23.71	±12.68	±6.66	±13.95	±15.09

M1, medio 199 + 5% FCS
n, número de células analizadas.

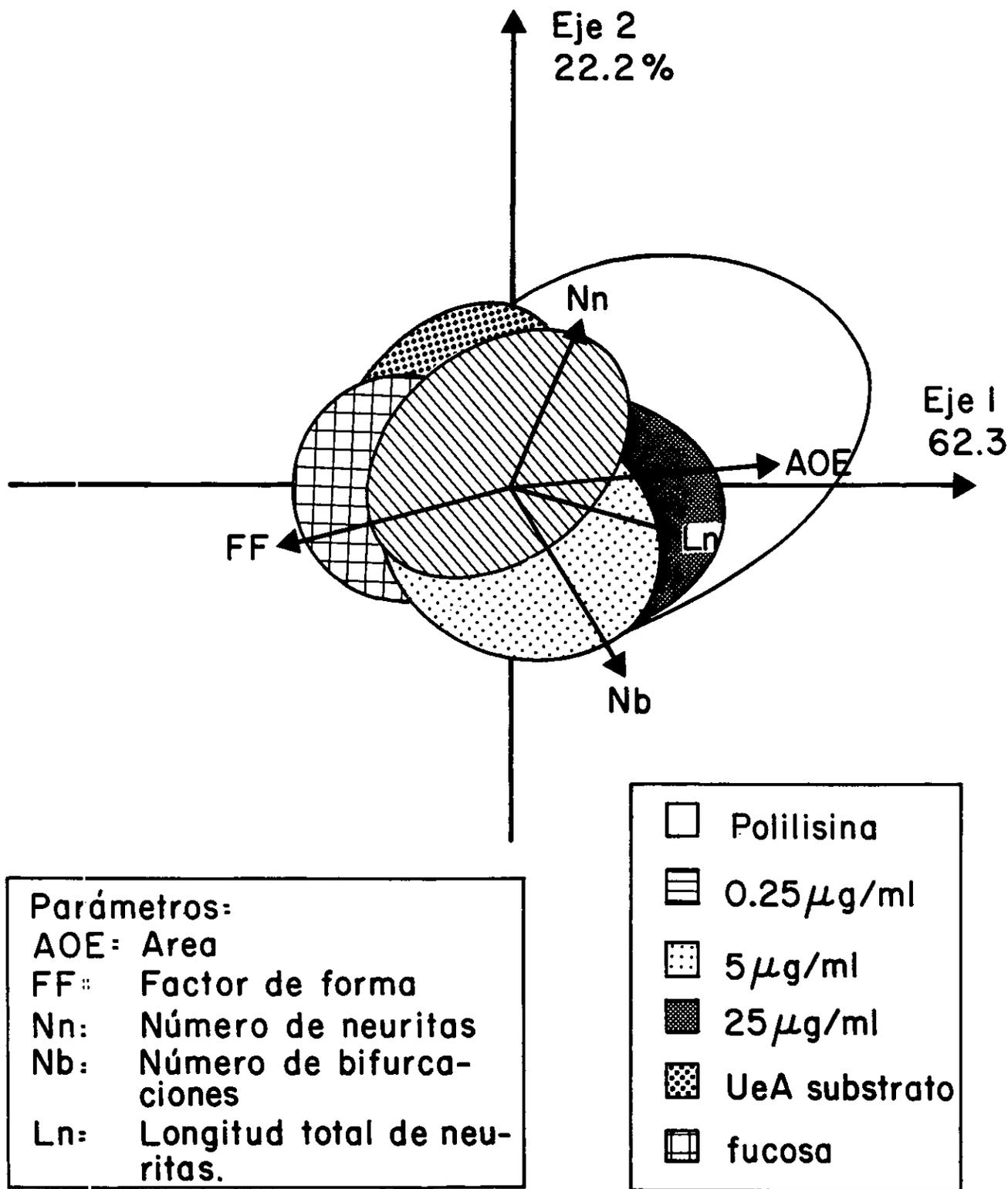


Figura 28 - Gráfica del análisis en componentes principales obtenido del grupo experimental UeAf y cinco parámetros neuronales. Agrupación del 84.5 % de los datos en el primer plano factorial.

FALTAN PAGINAS

De la: 67

A la: 68

utilizadas. Esta diferencia presenta la mayor significancia a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de PNA en solución ($p < 0.05$).

- El grupo PNA-substrato no presenta diferencias significativas de las poblaciones de 0.25, 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de solución de PNA ($F = 0.50$).
- El grupo del monosacárido inhibidor (galactoside) es diferente significativamente del grupo control (substrato de polilisina) tanto para los 3 parámetros de ocupación espacial ($p < 0.01$) como para los 3 parámetros neuríticos ($F = 4.77$, $p < 0.01$). Pero por otro lado, no tiene diferencia significativa del grupo PNA-substrato a excepción del parámetro Nb ($F = 5.24$, $p < 0.01$).

3.- Análisis en Componentes Principales.

El espacio formado por la intersección del eje 1 y el eje 2 agrupa 84.8% de la información total de los grupos experimentales (Figura 27). A pesar del gran recubrimiento entre las poblaciones estudiadas, las elipses de las poblaciones nos muestran ciertas tendencias:

- La localización en la parte izquierda de la gráfica de todos los grupos experimentales significa que en todos los casos existe inhibición del crecimiento neuronal.
- El efecto debido al substrato de PNA parece no diferenciarse del producido por la misma lectina en solución, a ninguna de las concentraciones utilizadas.
- No existe inhibición selectiva inducida por la galactosida, sobre el efecto inhibitorio del crecimiento neuronal producido por el substrato de PNA.

En resumen, el análisis cuantitativo realizado muestra que la PNA cuando se utiliza como substrato de cultivo disminuye significativamente el crecimiento neuronal respecto al grupo control ($p < 0.05$). Esta lectina cuando se expone en forma de solución provoca de forma similar una disminución en el crecimiento neuronal. Similar a los resultados obtenidos para la lectina WGA, el efecto producido por el substrato de PNA no parece depender exclusivamente a los grupos galactosidos libres de la membrana plasmática.

Solución de UeAf. Las concentraciones utilizadas de esta lectina en solución fueron 0.25, 5 y 25 $\mu\text{g/ml}$.

1. Promedios y errores estándares (Tabla X).

- Las concentraciones de soluciones de lectina UeAf 0.25 y 5 $\mu\text{g/ml}$ modifican el crecimiento de neuronas sensoriales en cultivo, disminuyendo los parámetros topológicos y neuríticos.
- A la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$, la solución de UeAf no muestra diferencias significativas para los parámetros AOE, POE, FF y Ln con respecto al grupo control (substrato de polilisina).
- Entre todos los grupos analizados no se observan variaciones en el parámetro Nn.
- La condición experimental que más disminuye el crecimiento neuronal es el grupo UeAf-substrato.

TABLA X.- PROMEDIOS Y ERRORES ESTÁNDARES A LA MEDIA DE 7 PARÁMETROS MORFOLÓGICOS OBTENIDOS DE CULTIVOS DE NEURONAS DISOCIADAS PARA ESTUDIAR EL EFECTO DE LA LECTINA UeA-f

Sustrato (concentración)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	Polilisina (10 µg/ml)	UeA-f (50 µg/ml)	UeA-f (50 mg/ml)
medio	M1	M1 + UeA-f (0.25 µg/ml)	M1 + UeA-f (5 µg/ml)	M1+UeA-f (25 µg/ml)	M1	M1+200 mM fucosa
	n=280	n=132	n=132	n=134	n=240	n=129
Ocupación espacial (O.E.)						
Área (AOE) (µm ²) ± EEM	11560.23 ±681.41	9060.29 ±703.92	9380.62 ±861.06	12165.60 ±792.57	8140.45 ±672.17	8268.77 ±570.81
Perímetro (POE) (µm) ± EEM	613.28 ±32.75	498.58 ±33.64	511.79 ±41.31	636.89 ±36.87	479.03 ±33.66	460.39 ±27.18
Factor de Forma (FF) ± EEM	437.76 ± 18.61	493.87 ±22.59	499.83 ±25.24	409.62 ±20.59	485.72 ±21.19	521.07 ±24.13
Forma Global (FG) ± EEM	0.39 ±0.02	0.32 ±0.02	0.32 ±0.03	0.32 ±0.04	0.30 ±0.03	0.26 ±0.02
Número de neuritas (Nn) ± EEM	1.40 ±0.06	1.25 ±0.08	1.17 ±0.07	1.17 ±0.08	1.30 ±0.08	1.17 ±0.07
Número de bifurcaciones de las neuritas (Nb)± EEM	0.56 ±0.08	0.28 ±0.10	0.30 ±0.09	0.29 ±0.09	0.17 ±0.06	0.14 ±0.06
Longitud total de las neuritas (Ln) (µm) ± EEM	234.82 ±24.33	159.51 ±19.81	158.67 ±19.83	207.66 ±18.84	145.68 ±13.53	134.62 ±12.39

M1, medio 199 + 5% FCS
n, número de células analizadas.

-El azúcar inhibidora (fucosa) no revierte el efecto producido por el grupo UeAf-substrato.

2. Comparación de varianzas y medias.

El análisis de la Tabla X muestra que el parámetro FG no es discriminante para esta lectina ($F = 0.95$). La comparación entre los grupos para los 6 restantes parámetros se resume así:

- La polilisina es significativamente diferente de los grupos 0.25 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de solución de UeAf para todos los parámetros de ocupación espacial ($p < 0.01$). No se observan diferencias significativas del grupo control con respecto al grupo UeAf en solución a 25 $\mu\text{g/ml}$, para ninguno de los parámetros analizados ($F = 1.15$).
- Los grupos UeAf-substrato versus 5 $\mu\text{g/ml}$ de UeAf en solución muestran ser similares respecto a los parámetros topológicos, pero diferentes en los parámetros Nn ($F = 2.81$, $p < 0.05$) y Nb ($F = 2.07$, $p < 0.05$). Al comparar el grupo UeAf-substrato con los grupos en solución de otras dosis los resultados son muy variables.
- El grupo azúcar fucosa es significativamente diferente del grupo control, pero no de grupo UeAf-substrato.

3. Análisis en Componentes Principales.

Las elipses de concentración representadas en el primer plano factorial (Figura 28), el cual agrupa 84.5% de la información total nos muestran que:

- Los grupos experimentales se localizan en posición central comparados con el grupo polilisina que se localiza más a la derecha. Esto significa que la lectina UeAf es menos favorable para el crecimiento neurítico que el substrato de polilisina.
- No se observa inhibición específica por la fucosa sobre un cultivo realizado sobre substrato de UeAf.
- La concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de UeAf es la condición experimental de este grupo que disminuye en forma mas drástica el crecimiento neurítico.

Se puede concluir que el substrato formado por UeAf no favorece el crecimiento neural, pero que probablemente este efecto inhibitorio no se debe exclusivamente a los sitios monosacáridos que reconoce la lectina. Esta proteína si se aplica en forma de solución afecta de forma variable el crecimiento neurítico (inhibiéndolo en todas las concentraciones).

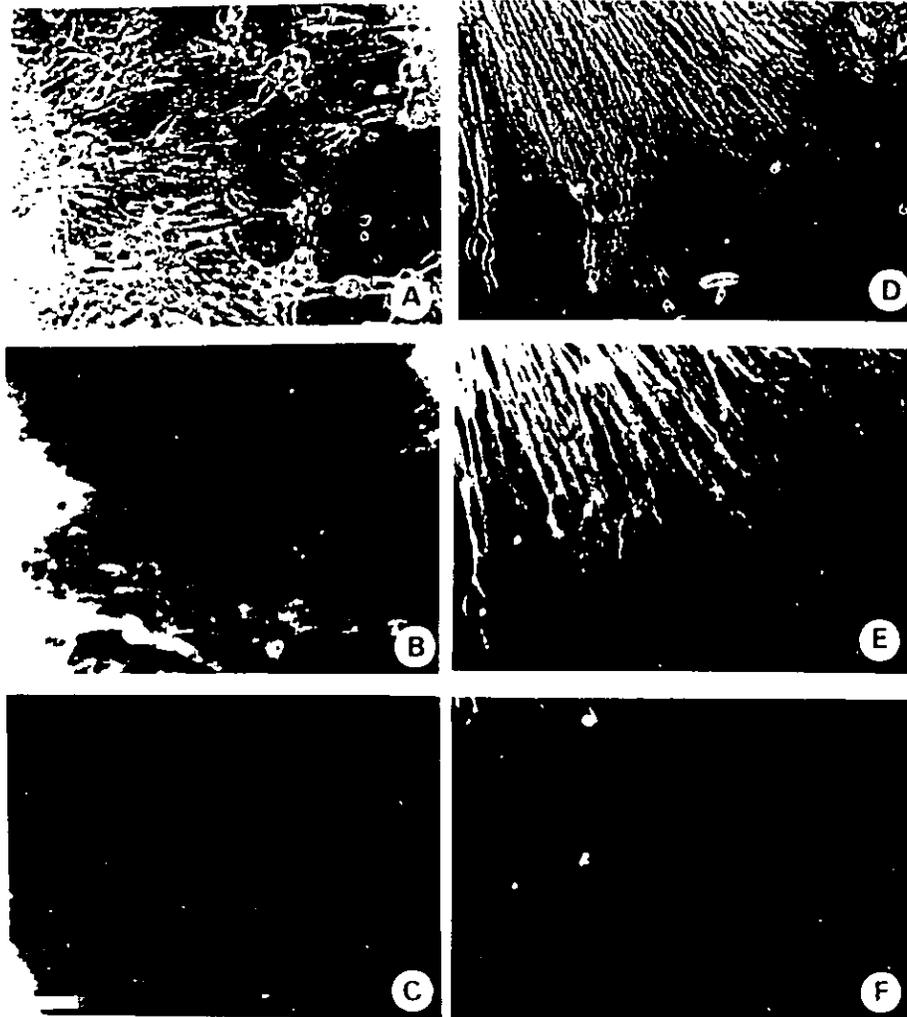


Figura 29 - Explantes ganglionares (A y D) y neuronas disociadas (B,C,E y F) de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivadas durante 24 horas y marcadas con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con A-FITC.

A, B y C - Substrato de polilisina + carbodiimida

D, E y F - Substrato de Con A + carbodiimida.

La unión de Con A-FITC en fibras nerviosas de explantes ganglionares es similar en ambos tipos de substratos. En neuronas disociadas, se observa un mayor marcado a nivel del soma y de las varicosidades presentes a lo largo de las neuritas.

A, C, D y F - Micrografías con epiluminiscencia

B y E - Micrografía en contraste de fase.

Escala: 50 μm (A y D) y 20 μm (B, C, E y F).

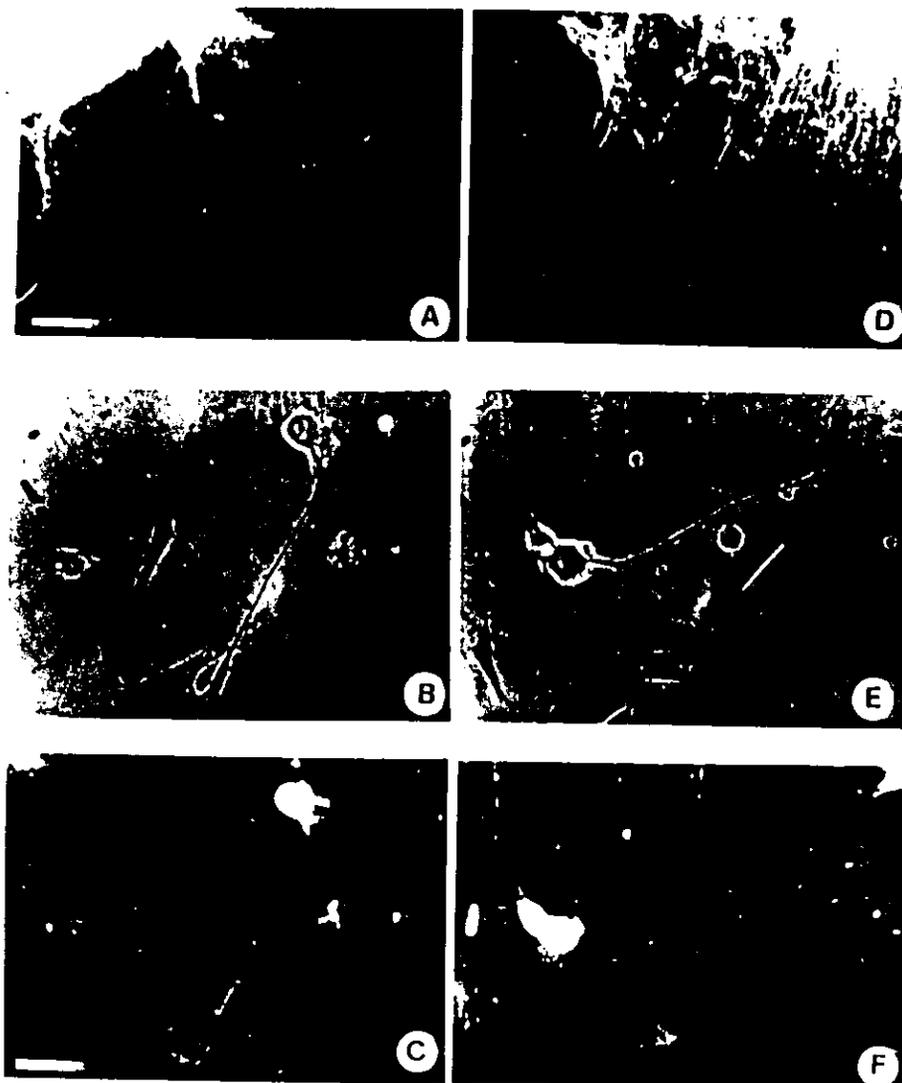


Figura 30 - Explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados durante 24 horas, después fueron marcados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de Con A-FITC (B y E) y faloidina-RTITC (C y F).

A, B y C - Substrato de Con A + carbodiimida.

D, E y F - Substrato de polilisina + carbodiimida.

Las fibras nerviosas cultivadas sobre un substrato de polilisina presentan una distribución paralela de los receptores membranares a Con A y los filamentos de actina intracelulares (E y F) a todo lo largo de la neurita. Sobre un substrato de Con A, se observa un poco marcado membranal de teceptores a la lectina y mayor de la actina en la parte distal de la neurita (B y C).

A y D - Micrografías en contraste de fase.

B, C, E y F - Micrografía con epiluminiscencia.

FALTAN PAGINAS

De la: 72

A la: 73

IV).- DOBLE INMUNOMARCAJE: LECTINAS-CITOESQUELETO

La distribución de ciertos oligosacáridos en la superficie membranal se puso en evidencia con la ayuda de lectinas exógenas marcadas con fluoresceína o rodamina. La identificación de filamentos de actina y de tubulina se realizó sobre explantes ganglionares.

1. Inmunomarcado por lectinas fluorescentes:

Dos lectinas se utilizaron, la Con A-FITC y la WGA-RTITC a una concentración de 100 µg/ml.

Explantes ganglionares.

Los cultivos de fibras nerviosas realizados sobre un substrato de polilisina (Figura 29, A) muestran un marcado a la Con A-FITC en forma disperso a lo largo de toda la superficie celular hasta la prolongación neurítica. Esta distribución del marcado se observa en las fibras cultivadas sobre un substrato de Con A (Figura 29, D). La diferencia en marca fluorescente observada en ambos casos, se debe a la gran densidad de neuritas presentes en el cultivo sobre el substrato de Con A. Los resultados obtenidos muestran que a pesar de que las neuronas se unen al substrato formado por Con A a través de sus grupos manosídicos expuestos en su superficie celular, sigue habiendo un gran número de sitios libres en la membrana celular, los cuales reaccionan con la lectina fluorescente.

El marcaje obtenido por la WGA-TRITC en explantes ganglionares cultivados sobre un substrato de WGA (Figura 31, B) es muy poco con respecto al obtenido sobre un cultivo realizado sobre un substrato de polilisina (Figura 31, E). Esta diferencia puede deberse al poco crecimiento inducido por la lectina.

Neuronas disociadas.

Ninguna diferencia significativa se observó en el marcado celular con Con A-FITC entre las neuronas cultivadas sobre un substrato de polilisina y aquéllas cultivadas sobre un substrato de Con A (Figura 29, C y D).

La fluorescencia se localiza distribuída a todo lo largo de la superficie celular, siendo mas intensa a nivel del soma celular.

a). Doble marcado Con A-actina.

Un débil marcado membranal con la Con A-FITC (Figura 30) se observa en fibras nerviosas cultivadas sobre Con A (B) o polilisina (E). Al observar la distribución de microfilamentos en las mismas fibras (C y F respectivamente) destacan los siguientes resultados:

- la actina se encuentra presente a todo lo largo de la neurita y llega hasta el cono de crecimiento (F),
- la distribución de receptores a Con A y moléculas de actina es similar en células cultivadas sobre polilisina (E y F) pero es diferente en neuronas creciendo sobre un

substrato de Con A (B y C). Es decir la actina se encuentra presente a todo lo largo de la fibra y la Con A principalmente en la parte proximal de ésta.

b). Doble marcado WGA-tubulina.

Las fibras nerviosas muestran un notable marcado con la WGA-RTITC cuando fueron cultivadas sobre un substrato de polilisina (Figura 31 E). La distribución de microtúbulos es similar a la de los receptores a la WGA (E y F).

Si el cultivo se realiza sobre un substrato de WGA, la tubulina no se observa con este método de inmunomarcado en células nerviosas ni gliales (C).

En conclusión las neuronas cultivadas sobre un substrato de Con A presentan una distribución de los receptores libres a la misma lectina diferente de la expresión intracelular de los filamentos de actina.

Las fibras nerviosas cultivadas sobre un substrato de WGA presentan un crecimiento muy reducido así como también una débil expresión de microtúbulos. Los cultivos control (en polilisina) presentan distribuciones similares entre los receptores a Con y actina o receptores a WGA y tubulina.

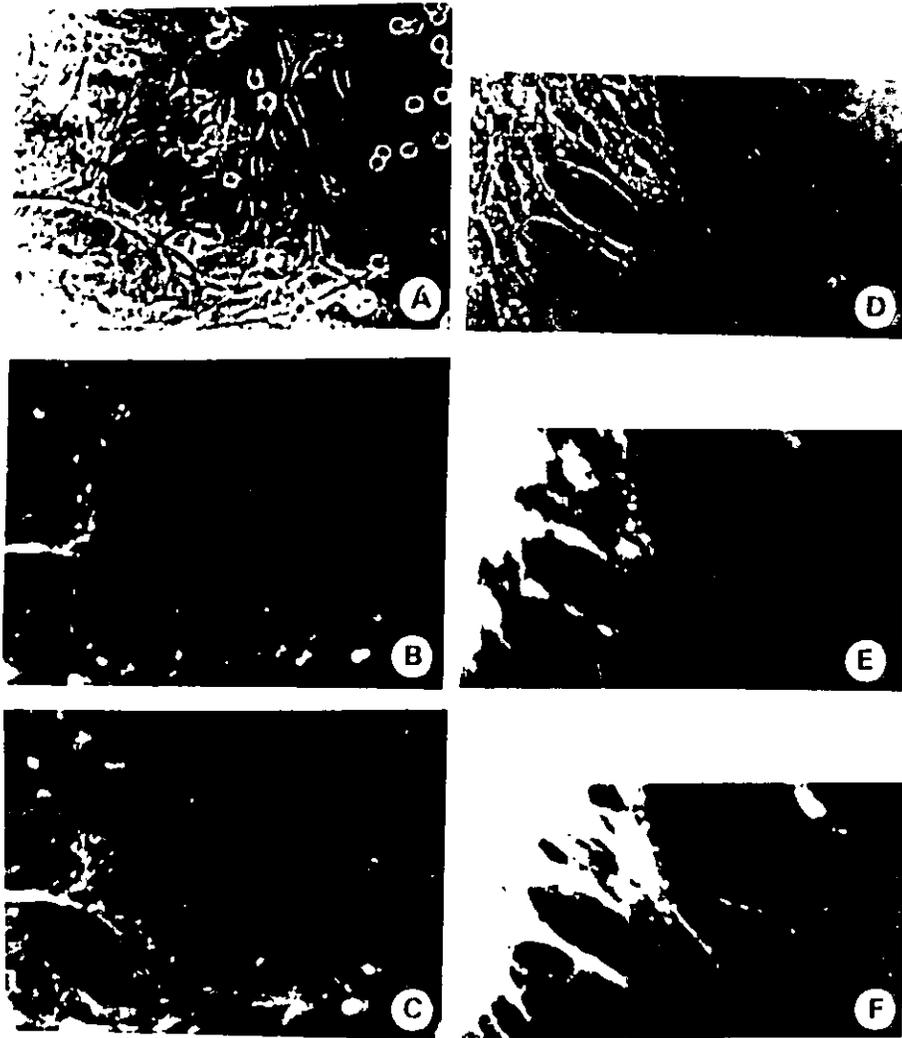


Figura 31 - Explantes ganglionares de la raíz dorsal de embrión de pollo cultivados durante 24 horas, después fueron marcados con 100 $\mu\text{g/ml}$ de WGA-TRITC (B y E) y anti- β -tubulina y un segundo anticuerpo acoplado a fluoresceína (C y F).

A, B y C - Substrato de WGA + carbodiimida.

D, E y F - Substrato de polilisina + carbodiimida.

Sobre el substrato de WGA, se observa un marcado tenue a WGA-TRITC y inmunoreacción negativa de los microtúbulos (B y C). Las fibras nerviosas cultivadas sobre polilisina presentan un notable marcado membranal de receptores a WGA y escasa inmunoreacción intracelular de los filamentos de tubulina.

A y D - Micrografías en contraste de fase.

B, C, E y F - Micrografía con epiluminiscencia.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este estudio experimental muestran que las lectinas aplicadas en cultivo modifican el desarrollo neuronal. Los cambios en el crecimiento de células nerviosas dependen del tipo de lectina (es decir, del monosacárido al cual reconocen) y de la forma de exposición de éstas (en forma de sustrato o en solución). Por lo tanto el análisis de resultados se realizará en dos secciones. En primer lugar se describirán las interacciones entre las moléculas de la matriz extracelular y el sistema nervioso durante la embriogénesis nerviosa. En seguida se discutirán los mecanismos de acción de moléculas difusibles en el mismo proceso de desarrollo. De esta manera se tratará de englobar los resultados obtenidos con los sustratos de lectinas y con las lectinas en solución.

MATRIZ EXTRACELULAR Y LECTINAS

La matriz extracelular ha sido definida como el medio ambiente natural en el cual las células de organismos multicelulares se encuentran embebidas. Se compone de moléculas que modulan la adhesión celular, el crecimiento, la morfología, la diferenciación y el alargamiento de la vida. La matriz extracelular no solo sirve como un sostén mecánico en el cual las células se adhieren o bien como un pegamento biológico que conecta y separa diferentes tejidos, sino que forma estructuras altamente especializadas como son el tejido conectivo, los tendones, los huesos y los dientes (Beck y Gruber, 1995).

Como se mencionó en la sección de Introducción, la matriz extracelular del sistema nervioso esta constituida de compuestos con gran diversidad bioquímica (Perris, 1997). Particularmente, entre las proteínas que conforman la matriz extracelular se han descrito ciertas lectinas y otras moléculas con función de tipo lectina, es decir con un componente de reconocimiento a glúcidos. Así, por ejemplo la ligantina descrita en la matriz extracelular del cerebro de rata adulta (Marchanese y cols., 1982) se considera una lectina endógena, debido a que reconoce de forma específica los grupos acetil-glucosamina de la membrana plasmática. En el sistema nervioso periférico, las células de Schwann secretan entre otras proteínas a la entracina, que es similar a la ligantina del sistema nervioso central y que funciona también como una lectina matricial (Rutka y cols., 1988).

Zanetta y colaboradores (1987), propusieron diversas funciones biológicas a la CSL (lectina soluble cerebral). Esta lectina matricial es secretada activamente por los astrocitos e interviene en la mielinización y la migración de los

neuroblastos (Kuchler y cols., 1988), así como en la formación de contactos intercelulares y de célula-matriz extracelular (Kuchler y cols., 1989) y probablemente en otros fenómenos neuronales. Recientemente se mostró que la CSL es una lectina polivalente que se une a glucoproteínas de la membrana de neuroblastos y de los propios astrocitos que la secretan, permitiendo la adhesión entre ambos tipos celulares y a su vez la migración de las neuronas inmaduras (Lehman y cols., 1990). La CSL y la R1 fueron dos lectinas que originalmente se aislaron del cerebelo de rata y tiempo después han sido reconocidas con una amplia distribución en varios tejidos de mamíferos (Zanetta y cols., 1992).

Las lectinas matriciales no solo han sido descritas en el sistema nervioso sino también en múltiples tejidos animales (Barondes, 1984; Kuchler y cols., 1989; Levi y Teichberg, 1989; Tenot y cols., 1989). Por ejemplo, en el pulmón de rata se ha descrito una lectina denominada "lectina-heparina de rata" y que tiene una estructura muy similar a la "lectina-heparina de pollo", la cual se localiza en el músculo embrionario y en el hígado del adulto. Estas dos lectinas, al unirse a la heparina y a la acetil-galactosamina, forman un puente entre la membrana celular y los glucosaminoglicanos (Barondes, 1984). A nivel pulmonar de rata, otra lectina "la lectina β -galactosida" se encuentra presente en grandes concentraciones en las fibras elásticas y los vasos sanguíneos en donde tiene una función en la elasticidad celular (Powell y Whitney, 1980). En el embrión de pollo, se ha mostrado que la lectina β -D-galactosida, interviene en la migración de células del endodermo embrional (Milos y Zalik, 1981).

Las lectinas matriciales también han sido descritas en condiciones patológicas y se proponen como posibles marcadores del proceso (Song y cols., 1993; Zanetta y cols., 1996). Un ejemplo de esto se tiene en una lectina endógena que se presenta bajo ciertas condiciones en células de un tipo de carcinoma humano (SCL-1), pero bajo irradiación grandes cantidades de estas moléculas se expresan en su superficie celular. Estas lectinas se unen a neoglicoproteínas de tipo α -L-rhamnosyl o α -D-glucosil (Condaminet y cols., 1997).

Una gran parte de los estudios realizados con el fin de observar el papel que juegan las lectinas de la matriz extracelular en los fenómenos celulares se ha llevado a cabo en cultivo de células, debido a la simplificación del modelo de estudio (Aplin y Hughes, 1981a, b; Rauvala y cols., 1981 a; Oppenheimer-Marks y Grinnell, 1981; Hatten y François, 1981; Chiquet y Acklin, 1986; De George y Carbonetto, 1981; Grumbacher-Reinert, 1989; Bauer y Tontsch, 1990). Así, el crecimiento y el desarrollo de las fibras nerviosas de embrión de pollo en cultivo varían en función del substrato utilizado (Letourneau, 1975; Saxod y Bizet, 1988). Nuestros experimentos realizados con diversos substratos de lectinas confirman estas observaciones. En particular, para la lectina Con A, la cual favorece el desarrollo neuronal de explantes ganglionares y de neuronas disociadas, ha sido también reportado por otros autores en diversos tipos neuronales (Aplin y Hughes, 1981a, b; Rauvala, 1981a y b, 1984; Chiquet y Acklin, 1986; Bauer y Tontsch,

1990). Sin embargo, todos esos reportes han sido sólo descriptivos y no cuantifican el crecimiento como lo realizamos en el presente trabajo.

En otros trabajos (De George y cols., 1985; Chiquet y Acklin, 1986) se ha mostrado un aumento en el número de neuritas formadas por célula, cuando se encuentran creciendo sobre un sustrato de Con A. Creemos que no existe contradicción entre estos resultados y los presentados en el presente estudio, ya que los reportes de dichos autores fueron observados únicamente durante las primeras horas del cultivo y por nuestra parte observamos el mismo efecto cuando realizamos experimentos similares (Figura 13). Es decir, que la inducción en el número de neuritas formadas por célula es un fenómeno temprano del desarrollo, el cual no perdura por largo tiempo, debido a que las fases tardías del crecimiento son controladas por mecanismos distintos. Así, para las neuronas sensoriales de embrión de pollo, solo una o dos neuritas predominan en el crecimiento.

Para las otras lectinas estudiadas (WGA, PNA y UeAf) nuestro trabajo experimental muestra que son sustratos que inhiben o disminuyen el crecimiento de explantes ganglionares y de neuronas disociadas. Cierta número de autores obtienen resultados diferentes en tipos celulares diversos. Por ejemplo, los fibroblastos no se adhieren a sustratos de PNA o de UeAf (Aplin y Hughes, 1981b; Carter y cols., 1981), y en contraste sobre la lectina WGA las células dérmicas y hepáticas muestran una gran adhesividad y un aumento en la migración celular (Davenport y cols., 1987; Oppenheimer-Marks y Grinnell, 1981). Comparar estos resultados por los obtenidos en este trabajo no resulta adecuado debido a la diversidad celular y el método utilizado para fijación de lectinas a la caja de cultivo.

Para analizar los resultados obtenidos en este estudio, es importante señalar previamente las condiciones experimentales utilizadas. Así, en primer término es necesario tener en cuenta que la carbodiimida (utilizada como agente acoplador de proteínas, para la técnica de fijación de sustratos) ha sido descrita como una molécula capaz de modificar ciertas características químicas de las proteínas (Pinto da Silva y cols., 1973). La combinación de la ferritina con la carbodiimida produce una proteína muy reactiva a las cargas negativas de los ácidos siálicos, pero también de ácidos urónicos (Wessels y cols., 1976), modificando el punto isoeléctrico de la molécula. Las modificaciones del crecimiento neuronal que observamos en nuestras condiciones experimentales, podrían estar inducidas por las variaciones provocadas por la carbodiimida sobre las lectinas estudiadas, sin embargo fué necesario su utilización como agente acoplador al plástico.

A pesar de que con el estudio cuantitativo realizado sobre los cultivos de células disociadas, no nos permite establecer diferencias significativas entre las lectinas WGA, PNA y UeAf, los cultivos de explantes ganglionares y el análisis cualitativo de los diversos tipos de crecimiento (Figura 7), nos muestra diversos

fenómenos ligados al crecimiento global de los ganglios como son: las interacciones entre las fibras, las ramificaciones, las relaciones entre tipos celulares, etc. Características específicas para cada lectina utilizada y con especificidad glucídica diferente.

La influencia de las lectinas utilizadas como sustratos de cultivo en diversos tipos celulares ha sido reportada en la mayoría de los trabajos sin un análisis de la posibilidad de que el efecto observado sobre las células pudiera ser el resultado de una doble acción de la lectina: tanto como sustrato de cultivo, así como compuesto en solución (liberado al medio de cultivo) (Donaldson y Mahan, 1984; Oppenheimer-Marks y Grinnell, 1981; Hatten y François, 1981). Esta hipótesis sólo ha sido discutida por De George y Carbonetto (1987) en su estudio realizado sobre los fenómenos implicados en la adhesión de las neuronas sensoriales de embrión de pollo. Los autores concluyeron que la Con A estimula la formación de "lamelas" en cualquiera de las dos condiciones en que se aplique la lectina, pero que los mecanismos de acción son diferentes. A pesar de que los resultados que obtuvimos en el presente trabajo no nos permiten excluir definitivamente la doble acción de la Con A sobre ciertos parámetros del crecimiento neuronal, sí podemos concluir que el parámetro número de bifurcaciones sólo es sensible a la aplicación de la lectina en forma de sustrato y no como solución.

También podemos proponer la hipótesis inversa, es decir, considerar que la lectina utilizada en solución pudiera adherirse al sustrato de cultivo y entonces ejercer sus acción como molécula fija. Chiquet y Acklin (1986) realizaron experimentos con el fin de excluir dicha hipótesis. Estos autores utilizaron como sustrato de cultivo la albúmina bovina, compuesto sobre el cual la Con A no se adhiere. Los resultados obtenidos sobre el sustrato de albúmina en presencia de una solución de Con A muestran que no existen cambios en el crecimiento neuronal, mientras que si el cultivo se realiza sobre un sustrato de Con A, el desarrollo neuronal se observa significativamente aumentado. Los resultados que presentamos aquí confirman la idea de que bajo la presentación soluble, la lectina Con A influye sobre el crecimiento neuronal. En la Tabla VII se indican los valores de los parámetros neuríticos obtenidos por la más baja concentración utilizada de Con A (0.25 $\mu\text{g/ml}$). Estos valores son significativamente diferentes de los del cultivo control (sustrato de polilisina), revelando el efecto de esa concentración de lectina en las células. Aún en el caso de que toda la lectina se fijara sobre el fondo de la caja de cultivo, su concentración es tan baja que resultaría insuficiente para ejercer una acción como sustrato de cultivo (Figura 1, Hatten y François, 1981). Otro argumento en favor de esta conclusión nos lo dan los resultados obtenidos para las más altas concentraciones de lectinas utilizadas en solución. La adhesión de células no se modifican en estas concentraciones y los cambios observados en los parámetros son menores de los que se obtienen cuando la Con A se aplica como sustrato de cultivo y sobre todo para el parámetro número de bifurcaciones (Tabla VI).

Otro dato importante a señalar, proviene de los resultados obtenidos en los estudios de fijación y liberación de las lectinas en el transcurso de las primeras 24 horas de cultivo. Los experimentos realizados mostraron por una parte, que las cantidades de lectinas adheridas son similares a las reportadas por la mayoría de otros estudios (Hatten y François, 1981; De George y Carbonetto, 1987), pero que las cantidades liberadas durante las primeras 24 horas son significativamente mayores a aquellas descritas en esos mismos trabajos. Así, nuestros resultados obtenidos del crecimiento de neuronas disociadas y cultivadas en presencia de una solución de Con A a una concentración de 0.25 μg (Tabla VII) muestran la acción de esta lectina en solución sobre el desarrollo neuronal. Sin embargo, dicha estimulación del crecimiento no alcanza a ser tan significativa como la inducida con la misma lectina en sustrato. Por otro lado y apoyando la especificidad de la unión lectina-membrana celular, nuestros resultados obtenidos con la manosidasa sugieren la existencia de una unión específica entre el sustrato de Con A y la membrana de la neurona.

Nuestros experimentos realizados con neuronas sensoriales cultivadas sobre sustratos de lectinas y en presencia de azúcares inhibitorias, mostraron que la inhibición de éstas es parcial y en algunas ocasiones se presenta también en cultivos realizados sobre el sustrato de polilisina. Diferencias en el grado de inhibición también fueron observadas dependiendo del tipo de sustrato y el tipo de preparación utilizada: explante ganglionar o neuronas disociadas.

Respecto a los experimentos realizados con las tres lectinas que inhiben el crecimiento neuronal (PNA, WGA y UeAf) no observamos ningún efecto después de la adición de los azúcares de competencia específica. Es decir, el efecto inhibitorio de estas lectinas sobre el crecimiento neuronal no está directamente ligado a los sitios específicos de los azúcares de la membrana. Esta conclusión no excluye sin embargo, la participación de esos sitios en unión con otros compuestos de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, etc.). (Ver discusión más adelante). Sin embargo, sobre el sustrato de polilisina la adición de 100 mM de glucosamina produce una disminución del crecimiento neurítico de explantes ganglionares (De George y Carbonetto, 1987). Resultados similares han sido reportados por diversos autores (Hatten y François, 1981; Rauvala y Hakomori, 1981; Davenport y cols., 1987). Para Turner y cols., (1987) el retraso en el crecimiento está provocado por la interacción de la lectina con canales de magnesio, los cuales son necesarios para el buen funcionamiento del receptor a fibronectina.

La falta de efecto de ciertos azúcares específicos en nuestros experimentos puede deberse a que algunas lectinas poseen además del segmento de reconocimiento a sacáridos otras secuencias con especificidades distintas (Outenreath y Jones, 1992). Una lectina endógena la L14 presente en ganglios de la raíz dorsal de rata cuando se coloca en cultivo induce la formación de

agregados ricos en fibras nerviosas, sin embargo no se logra bloquear este efecto con altas concentraciones de las azúcares que reconoce, lo cual se propuso que parte de su efecto se realiza por un dominio diferente del sitio de interacción con carbohidratos (Outenreath y Jones, 1992).

La inhibición del crecimiento neuronal provocada por la manosa sobre las neuronas disociadas y cultivadas sobre un substrato de Con A, nos permite proponer un efecto específico de los grupos de tipo manosa de la membrana celular. Estudios realizados en condiciones similares mostraron que la adición de 50 a 100 mM de manosa inhibe de 60 a 80% la adhesión de neuronas de cerebro de rata (Hatten y François, 1981), la formación de "lamelas" de neuronas sensoriales de pollo (De George y Carbonetto, 1987) y el crecimiento neuronal de ganglios de Tritón (Chiquet y Acklin, 1986). En los dos primeros casos, el efecto del azúcar no se observó durante las primeras horas del cultivo, esto es debido a que los fenómenos de adhesión y de crecimiento neural son fenómenos que involucran diferentes mecanismos celulares (Letourneau y Wessells, 1974). Nosotro para evitar observar un efecto en la adhesión más que en el crecimiento, realizamos nuestros experimentos de inhibición después de transcurrida la primera fase de adhesión y de inicio del desarrollo de neuritas, es decir, después de 4 horas de sembrado el cultivo.

Los resultados obtenidos con la manosidasa confirman los mismos resultados, es decir que la interacción del substrato de Con A con las fibras nerviosas es por medio de moléculas de tipo manosídicas. Los trabajos de De George y Carbonetto (1987) y de Milos y Wilson (1986) describen efectos similares después de la aplicación de glucosidasas. En este caso el tubo neural de *Xenopus* presenta receptores glúcidos implicados en la migración celular y corresponden a galactosas libres y/o recubiertas de ácidos siálicos.

El recubrimiento de células por ácidos siálicos se ha descrito en diversos tipos celulares (Schlosshauer, 1985; Trinkaus-Randal y cols., 1988; Berezouskaya y cols., 1995). Es probable que un fenómeno similar al de *Xenopus* de recubrimiento se encuentra presente al nivel de la piel, donde a pesar de la presencia de múltiples grupos manosa en la superficie celular, las células no migran sobre un substrato formado de Con A sino hasta que se les quita el recubrimiento siálico (Donalson y Mahan, 1984).

La presencia de glucosidasas en la superficie celular ha sido igualmente descrita en cultivos (Rauvala y Hakomori, 1981; Matsui y cols., 1986; Bodo y cols., 1988). En todos los sistemas estudiados estos compuestos varían en función de la edad del cultivo y están participando en fenómenos tan diversos como la migración de células de la cresta neural (Runyan y cols., 1986), adhesión de fibroblastos (Rauvala y Hakomori, 1981) y en relación con otros compuestos como glucosaminoglicanos (Bodo y cols., 1988), fibronectina y laminina (Runyan y cols., 1986).

Begovac y colaboradores (1991) mostraron que la presencia de galactosiltransferasa (Galtasa) en la superficie celular de células mesenquimatosas y de la línea celular PC12 facilita la migración sobre un substrato de laminina. Esta enzima cataliza los residuos de N-acetil-glucosamina del fragmento E8 de laminina (Runyan y cols., 1988). Además, se encuentra diferencialmente distribuida en células diferenciadas de la línea PC12 (Begovac y Shur 1990), presentándose preferencialmente en el cono de crecimiento y lamelidopodia. Esto significa que la glucosilación de ciertos compuestos de la matriz extracelular puede ser realizada a nivel de la membrana celular e influir en el crecimiento y la forma celular. Un caso parecido puede presentarse en varios tipos celulares durante su crecimiento y en especial en neuronas en desarrollo como las utilizadas en nuestro trabajo. Esta proposición esta basada en el reporte de Riopelle y Dow (1991), quienes describen la presencia de Galtasa en la superficie de neuronas sensoriales de embrión de pollo, las cuáles glucosilan a laminina pero no a fibronectina en presencia de uridin 5' galactosa. La exposición de tripsina inhibe el efecto, demostrándose que la función es a nivel de la membrana celular.

Las altas concentraciones de GlcNAc requeridas para inhibir parcialmente el crecimiento de neuritas en nuestros resultados puede estar relacionado con la presencia de glucosiltransferasas en la membrana celular de los explantes nerviosos de la raíz dorsal de embrión de pollo.

La presencia de sistemas enzimáticos involucrados en el crecimiento neurítico no son exclusivos de los sistemas de glucosilación, también se han descrito la enzima activadora de plasminógeno en células granulares (Krystosek et al 1981) y metaloproteasas (Pittman 1985 y 1989).

Las glucosiltransferasas han sido clonada en sistemas biológicos con el fin de estudiar su función y localización celular. En especial tres tipos de fucosiltransferasas se han transfectado en células de conejos y han mostrado que dos de ellas son secretadas de neuroblastomas y otros tipos celulares (Hitoshi y cols., 1996).

a. Receptores de membrana.

Probablemente las lectinas endógenas forman un tipo especial de proteínas de la matriz extracelular. Esta propuesta esta basada en diversos resultados experimentales de otros autores tales como los estudios inmunocitoquímicos en los cuales se muestra que las células secretan continuamente lectinas solubles y que estas proteínas pueden permanecer en la proximidad de las células productoras en forma de compuestos de la matriz extracelular (Milos y Zalik, 1981; Barondes, 1984). Como sabemos, los compuestos de la matriz extracelular están formados en forma muy importante de glucoconjugados (mucina, heparina, etc.), no sería nada difícil de imaginar que ellos sean los ligandos naturales de las

lectinas endógenas. Por otra parte se sabe que dichos compuestos varían su concentración durante el desarrollo embrionario en forma paralela a las lectinas endógenas (Hay, 1981). Por lo cual se ha sugerido que ambos grupos participan en la organización de la matriz y en la morfogénesis neural.

Con base en esta hipótesis surge la interrogante de cual sería el (los) elemento (s) de reconocimiento a nivel de la membrana plasmática de dichos compuestos matriciales. Compuestos de la matriz extracelular como la fibronectina y la laminina, poseen receptores específicos en la membrana celular (Carbonetto y cols., 1988). De forma similar se han descrito los posibles receptores de las lectinas endógenas (revisión de Barondes, 1984) de donde los mejor conocidos son la mucina intestinal del pollo, el cual tiene gran número de terminaciones galactosidas y que funciona como el receptor de la CLL II (chicken lactose lectin II) y el glucosaminoglicano muscular de embrión de pollo, el cual reconoce específicamente a la "chicken heparin lectin".

En el cerebro embrionario del pollo, se han descrito receptores siálicos y acetil-glucosamino durante el desarrollo de las fibras nerviosas, pero en cambio las fibras pioneras muestran terminaciones galactosil (Miyake y cols., 1985). La importancia de estas diferencias estructurales durante la morfogénesis neuronal se encuentra en estudio. Así, a nivel periférico, las células ganglionares de embriones de rata en desarrollo, producen dos lectinas con especificidad β -galactoside (Dodd y Jesell, 1986), al mismo tiempo que las membranas plasmáticas expresan los receptores correspondientes. Por lo tanto durante la embriogénesis las fibras sensoriales se desarrollan en dirección de las lectinas endógenas de la matriz. Por otra parte, la mielina está compuesta en más de un 50 % de la glucoproteína Po, la cual presenta epitopes L1/HNK-1 y L3 que han sido reconocidos como ligandos a proteínas neuronales y que intervienen en la adhesión y el crecimiento neurítico (Bollensen y cols., 1990).

La identificación de receptores membranales a lectinas es posible con la utilización de lectinas exógenas marcadas (Bee, 1982). Numerosos trabajos han descrito la presencia o ausencia de estos componentes en el sistema nervioso (Koda y Patlow, 1976; Sieber-Blum y Cohen, 1978; Carbonetto y Argon, 1980; Huck y Hatten, 1981; Bee, 1982; Fabian y Coulter, 1985; Miyake y cols., 1985). La relación entre los receptores de membrana y la neurogénesis, se describe en el trabajo de De Grauw y Luwnice (1986) quienes demuestran una reactividad positiva de los neuroblastos a la PNA y la RCA100, lectinas que se expresan durante la migración. Los trabajos de Muramatsu (1988a y b) muestran que en ratones, la lactosamina es el receptor involucrado en las primeras etapas de la identificación celular.

La identificación de neuronas sensoriales de la raíz dorsal de rata ha sido realizada por medio de la lectina de vegetal *Bandeiraea simplicifolia*, la cual identifica galactosa que se encuentran en la membrana de un tipo neuronal

arnielínico que inerva preferentemente la piel (Plenderleith y Snow, 1993). Esta es una aplicación práctica de las lectinas en investigación básica y aplicada, ya que se pueden identificar poblaciones celulares específicas tanto en procesos normales de desarrollo como en casos patológicos (ver adelante).

A nivel del cono de crecimiento, la existencia de receptores específicos que controlan y dirigen la motilidad ha sido ampliamente estudiada (Chang y cols., 1987; Dodd y cols., 1988; Letourneau, 1987; Letourneau y Shattuck, 1989). Las diferencias en el comportamiento entre las fibras pioneras y las fibras secundarias han sido descritas tanto en invertebrados (Goodman y cols., 1982; Vanhems y Delbos, 1989) como en vertebrados (Eisen, 1988; Shiga y Oppenheim, 1991). Los fenómenos de reconocimiento y de repulsión entre poblaciones de neuronas centrales y periféricas (Letourneau, 1987) son controladas por glucoproteínas específicas de la superficie celular. El papel de las glucoproteínas de membrana en la formación de redes neuríticas fue descrito por Chang y colaboradores (1987). Sin embargo, esos receptores favorecen la elongación de fibras pero no la dirigen (Dodd y Jessell, 1988).

La acumulación de compuestos específicos a nivel del cono de crecimiento se propone como un mecanismo regulador de las funciones tales como: direccionalidad (TAG-1, Dodd y cols., 1988); la motilidad (sistema P1/proteín-kinasa C, Pfenninger, 1988) y la elongación neurítica (GAP-43, Gordon-Weeks, 1989; Sorgett, 1989). Las neuronas sensoriales de embriones de pollo son capaces de regular la expresión de receptores membranales en respuesta a la matriz extracelular a la cual se encuentren expuestas, especialmente de condroitin sulfato (Snow y Letourneau, 1992).

El estudio de la composición de proteínas del cono de crecimiento, por medio de la técnica de cromatografía fina, demuestra que las proteínas más abundantes se unen preferentemente a la WGA y a la RCA100 (Greenberg y Pfenninger, 1986). Las integrinas L1, N-CAM, A-CAM y MAP2 están presentes en todo el cono de crecimiento de neuronas simpáticas de pollo, en cambio la espectrina y la fodrina se localizan especialmente en la parte central del mismo (Letourneau y Shattuck, 1989).

Recientes estudios proponen la interacción de lectinas con receptores de membrana tales como los de laminina y de fibronectina. Aplin y Hughes (1981b) propusieron una interacción entre los receptores de membrana a la fibronectina y las moléculas de Con A, lo que permitía a los fibroblastos su adhesión y estabilización sobre dicha lectina con modificaciones de su citoesqueleto. La WGA reconoce específicamente una glucoproteína membranal que tiene el mismo peso molecular que el receptor a fibronectina (Pytela y cols., 1985; Patel y Lodish, 1985; Tuan y Grinnell, 1988). El equipo de Montsita describió el efecto inhibitorio de la Con A sobre la adhesión de los fibroblastos de embrión de pollo sobre un sustrato de laminina (Codogno y cols., 1988). El receptor responsable de este

efecto se aisló y comparó con el receptor a laminina (Montsita y cols., 1990). Similar a lo descrito para WGA, el receptor a Con A en este sistema presenta un peso molecular muy semejante al del receptor a laminina, y se propone que podría ser a través de ésta unión que ejerce su acción inhibitoria.

Varias lectinas endógenas han sido descritas en el embrión de pollo (Akimoto y cols., 1995; Barondes, 1984; Milos y Zalik, 1981). Así, durante la diferenciación de la dermis y la epidermis, se han descrito dos galectinas (de 14 y 16 KDa) (Akimoto y cols., 1995), las cuales muestran una distribución diferencial a lo largo del desarrollo embrional en la membrana basal y la matriz extracelular de estas capas celulares, lo cual induce una distribución también diferencial en el patrón de inervación (Verna y cols., 1989). Por la expresión de lactosaminas, se proponen como ligandos endógenos de estas isolectinas a la laminina y la fibronectina. De esta forma estas lectinas podrían formar puentes entre estos compuestos de la matriz extracelular y las células de la piel y las fibras nerviosas que las inervan.

Por otro lado se sabe el papel fundamental de la concentración extracelular de diversos iones en el funcionamiento de los receptores membranales durante la neurogénesis. Así, se sabe que el receptor a laminina depende de la concentración de iones magnesio (Turner y cols., 1987) y de calcio (Ross y cols., 1988). Numerosos autores proponen que la acción de las lectinas sobre el sistema nervioso se llevan a cabo por la variación en la conductancia iónica. Así por ejemplo, la lectina Con A produce cambios en la conductancia al calcio (Kater y cols., 1988; Komada y cols., 1996), en la distribución funcional de los canales a calcio (Ross y cols., 1988) y en la activación de canales de potasio (Lin y cols., 1989). Todos ellos en paralelo al aumento en la elongación neurítica. En neuronas de *Helix aspersa* la aplicación extracelular, pero no intracelular de Con A altera los niveles intracelulares de iones de calcio y varias enzimas involucradas en la cascada de segundos mensajeros (Arvanov y cols., 1993).

Los efectos producidos por la lectina WGA en diversos sistemas animales también han sido involucrados con cambios en la conductancia iónica (Komada y cols., 1996; Yatomi y cols., 1995) y en su interacción con los receptores a NGF (Landreth y cols., 1985).

b). Crecimiento Axonal.

El crecimiento neuronal está controlado por múltiples factores moleculares y celulares (Turner y cols., 1987; Dodd y Jessell, 1988; Rotshenker, 1988). La estructura celular que controla este fenómeno es el cono de crecimiento (Eisen, 1988).

A partir de diversas observaciones *in vivo* (Harris y cols., 1987) e *in vitro* (Bray y Chapman, 1985) dos modelos de crecimiento axonal se han propuesto, el

modelo de presión (push) y el modelo de tensión (pull). Ambos modelos no son independientes, sino que sólo dependen de factores reguladores independientes.

En el primer modelo (push), los compuesto membranales y los elementos del citoesqueleto que se sintetizan en el soma, son transportados hacia el extremo distal del proceso. La presión ejercida a nivel terminal provoca la elongación axonal (Bray, 1987). Por otro lado, el segundo modelo propone que la adhesión del cono de crecimiento a la materia extracelular provoca una tensión de la fibra que produce una elongación neurítica (Bray y Chapman, 1985).

Los experimentos realizados por Letourneau y sus colaboradores muestran que diversos factores están involucrados en el mecanismo de crecimiento neurítico. La elongación axonal se logra aún después de agregar citochalcina B, la cual provoca el rompimiento de microtúbulos dentro del cono de crecimiento (Marsh y Letourneau 1984). Sin embargo, el taxol inhibe la elongación neurítica (Letourneau y Ressler, 1984).

Diversos experimentos han mostrado que la matriz extracelular puede transmitir mensajes al citoesqueleto por medio de las integrinas de la membrana celular (Rutka y cols., 1988). Sin embargo, a pesar de que estos experimentos se realizaron sobre substratos que permiten una buena adhesión (condición esencial pero no suficiente, Hoffman y Lasek, 1980), mientras haya una alteración del citoesqueleto, el crecimiento axonal no se produce (Rotshenker, 1988).

Los trabajos del equipo de Letourneau (1986, 1987, 1988) muestran que la tensión generada por el cono de crecimiento (pull) puede promover la elongación pero que la tasa de elongación basal parece ser el resultado de la presión (push) ejercida por el transporte anterógrado. En otros términos, la síntesis y el transporte de compuestos neuróticos (push) pueden estar modulados por el cono de crecimiento (pull) como también se desprende de experimentos de regeneración y lesión axonal.

Los factores reguladores de tipo molecular (integrinas, proteasas, factores tróficos, matriz extracelular, moléculas de adhesión, iones, etc.) presentan durante el desarrollo neuronal variaciones espaciales y temporales, que complican su descripción. Además, factores celulares propios de cada neurona o transmitida por otras células deben de ser también tomados en cuenta.

Por todo esto no podemos más que proponer alguna hipótesis sobre los mecanismos implicados en el crecimiento axonal de neuronas sensoriales de embrión de pollo sobre el substrato de Con A. Esta lectina es un substrato muy adhesivo (Aplin y Hughes, 1981b; Carbonetto, 1984), así la tensión que ejerce la adhesión del cono de crecimiento sobre la Con A promueve la elongación neurítica (pull), produciendo un mayor valor en el parámetro Longitud y una mayor arborización (Nb). Existe sin embargo, un trabajo de Rousset y cols., (1990) que

muestran que el crecimiento del proceso axonal es mejor sobre sustratos de baja adhesión y que las dendritas al contrario prefieren la gran adhesividad. Este modelo sugiere diferencias en el comportamiento debidas a diferencias en la viscosidad de los procesos neuríticos.

Diversos trabajos realizados sobre sustratos de laminina y merosina apoyan la teoría propuesta originalmente por Trinkaus (1985) de un aumento en la motilidad neuronal es producido por una disminución en la adhesión (Mc Clay y cols., 1987; Neugebauer y cols., 1988; Calof y Lander, 1991). Este mismo efecto ha sido observado en otros tipos celulares (Enguall y cols., 1992) y es explicado como un proceso que es tiempo-dependiente, ya que la adhesión implica la formación de fuerzas de unión y de contactos focales (Lotz y cols., 1989) y la migración puede ser inducida en menos tiempo.

Para interpretar los resultados obtenidos sobre sustratos de lectinas que inhiben o retardan el crecimiento neuronal, se puede proponer que se tratan de sustratos de baja adhesividad para este tipo neuronal. Un caso especial lo es la WGA, donde se sabe que es un sustrato que favorece la adhesión de neuronas (Hatten y François, 1981) y de otros tipos celulares (Oppenheimer-Marks y Grinnell, 1981; Rauvala y Hakomori, 1981) pero que inhibe el crecimiento. Múltiples explicaciones se han propuesto como que la adhesión es tan fuerte que impide completamente el movimiento celular (Rousselet y cols., 1990) o que la lectina se desprende y provoca toxicidad celular (ver siguiente sección). En el trabajo de Turner y colaboradores (1987) se propone que la WGA podría unirse a ciertos sitios de la membrana celular que están involucrados en el intercambio de iones magnesio, los cuales son necesarios al buen funcionamiento del receptor a fibronectina.

El citoesqueleto es una estructura fundamental en el fenómeno de crecimiento neurítico (Carbonetto 1984; Letourneau, 1981, 1982, 1983, 1987; Larkord y Letourneau, 1989). Los conos de crecimiento cambian de forma en función de la orientación del citoesqueleto y éste a su vez depende de su asociación con la fibronectina a través de receptores específicos (Carbonetto, 1984; Codogno y cols., 1988; Moutsita y cols., 1990). La actina está altamente concentrada en el cono de crecimiento (Letourneau y Ressler, 1984) y se extiende hacia los filopodios (Bray y Hollenbeck, 1984) además de localizarse específicamente en los sitios de adhesión celular con el sustrato (Letourneau, 1981). La formación de neuritas está relacionada a la redistribución de receptores a Con A y a la reorganización del citoesqueleto (Isenberg y cols., 1978; Krystosek, 1982; Katayama y cols., 1990). Así, nosotros observamos una distribución similar de los filamentos de actina y de los receptores membranales a Con A en neuronas sensoriales de embrión de pollo en cultivo.

Respecto a las células no neuronales, parece ser que la Con A provoca en cultivo una reorganización del citoesqueleto (Badley y cols., 1981; Painter y

G nsberg, 1982; Jung y cols., 1984; De George y cols., 1985; Wheeler y cols., 1985; Pagliaro y Wolfe, 1987). La formación de "parches" y de cúmulos de los receptores de Con A está asociada a las reorganizaciones de las fibras de miosina (Ash y Singer, 1976; Condeelis, 1979; Patton y cols., 1989) y de actina (Condeelis, 1979; Rao y Varani, 1982; Turner y Shotton, 1987).

Otras lectinas, como la WGA, provocan una disminución de la F-actina (Sjolander y Magnusson, 1988), efectos comparables se obtuvieron por adición de SBA (Draaijer y cols., 1989). La distribución de microfilamentos en el cono de crecimiento parece ser el punto crítico en la generación de un nuevo axón en neuronas de embrión de rana (Tanaka y Kirschler, 1991). Esta misma hipótesis puede ser aplicada en nuestros resultados obtenidos de neuronas sensoriales de embrión de pollo cultivadas sobre un sustrato de WGA, en las cuales las fibras nerviosas no presentan inmunoreacción al anticuerpo contra tubulina que influiría en el poco crecimiento neurítico.

Los resultados presentados en este trabajo muestran una redistribución de microfilamentos de actina al nivel de neuritas cuando el cultivo se realizó sobre un sustrato de Con A. Esta redistribución se produce probablemente en respuesta a las fuerzas ejercidas por el sustrato sobre la membrana celular (pull). La inhibición del crecimiento de fibras nerviosas sobre un sustrato de WGA parece estar relacionado con modificaciones de microtúbulos y de receptores membranales de la lectina. Amieva y Furthmayr (1995) proponen tres niveles de interacción de las moléculas del citoesqueleto que influyen en el crecimiento neuronal: primero la polimerización de actina daría la fuerza del "push"; en segundo lugar la interacción de la miosina con los microfilamentos causaría un deslizamiento de los filamentos y esto en combinación con la polimerización de actina impulsaría al filopodio y por último la fuerza osmótica generada sería la responsable de la elongación

LECTINAS SOLUBLES

La presencia de lectinas difusibles en el sistema nervioso sugiere una función neurotrópica. Kuchler y cols., (1989) mostraron que la CSL parece ser un factor neurotrófico para las neuronas simpáticas de rata al intervenir en varias fases de la ontogénesis cerebral (mielinización, migración, contacto célula-célula y célula sustrato, etc.) pero que no es un factor de crecimiento. Fabian y Coulter (1935) al estudiar el transporte axonal de lectinas exógenas en diferentes nervios de rata, observaron un transporte anterógrado y transneuronal de Con A, PGA, LCA y WGA en nervios ópticos y trigémino, lo que sugiere un papel trófico entre nervios y tejidos blancos. Barde (1988) discute este aspecto y concluye que aunque no se puede considerar que este tipo de proteínas tengan un papel neurotrófico, sin embargo poseen funciones muy importantes en el desarrollo ontogénico.

Una característica de todas las moléculas difusibles que juegan un papel en la embriogénesis es su variación temporal durante el desarrollo. Por ejemplo, la CLLI presenta una concentración máxima en el doceavo día del desarrollo embrionario del pollo, con una localización inicial intracelular que después de la mitogénesis se vuelve extracelular (Barondes y Haywood-Reid, 1981). Las lectinas solubles o galectinas: L-14 y L-29 son secretadas diferencialmente durante el desarrollo de los mamíferos y su unión a la laminina depende también del momento de dicho desarrollo (Massa y cols., 1993). La glucoproteína plasmática HPRG se une específicamente a linfocitos T en procesos inflamatorios induciendo en éstos su activación y proliferación (Lamb-Wharton y Morgan, 1993).

Varios investigadores han estudiado el efecto de lectinas exógenas aplicadas extracelularmente sobre el crecimiento neurítico (Isenberg y cols., 1978; Hatten y François, 1981; Miller, 1981). Los resultados de De George y cols., (1985) muestran que la adición de Con A en el medio de cultivo provoca un aumento en la adhesión celular y la formación de filopodios y lamellas. Estas modificaciones son dosis-dependientes con un máximo efecto a la concentración de 25 µg/ml e inhibición con 100 mM de manosa. Las diferencias en el método de estudio utilizadas en este trabajo pueden explicar la divergencia de resultados. Es decir, el grupo de trabajo de De George aplica el tratamiento como una preincubación de 1.5 hora antes de iniciar el cultivo celular, mientras que nosotros aplicamos las lectinas en forma continua después de la adhesión celular.

Respecto a WGA, nuestros resultados son totalmente comparables con los de De George y Carbonetto (1986), en el cual con el pretratamiento de la lectina se provocó la inhibición del crecimiento neurítico. Además, estos autores mostraron que la WGA disminuyó significativamente el número de neuritas (Nn) efecto que se reduce al aplicar 100 mM glucosamina. Nuestros experimentos confirmaron estos resultados que también obtuvieron Turnet y colaboradores (1987) con concentraciones tan bajas de WGA de 5 µg/ml. El mecanismo de inhibición inducido por la WGA es diferente del mecanismo de acción de venenos metabólicos que inhiben la síntesis de proteínas (De George y Carbonetto, 1986). La lectina WGA se puede unir a los receptores a NGF en neuronas (De George y Carbonetto, 1986), introducirse dentro de ellas (Letourneau, 1979) y transportarse intracelularmente (Lavail y cols., 1983; Fabian y Coulter, 1985) o unirse a glucosaminoglicanos (Toda y cols., 1981) y a proteoglicanos (Horst y cols., 1987). Intracelularmente actúa inhibiendo el transporte de proteínas nucleares al bloquear los poros nucleares (Findlay y cols., 1987). De esta forma, sus efectos en la inhibición del crecimiento neurítico se debe a su acción sobre el metabolismo nuclear.

Hashimoto y Hagino (1989) mostraron que WGA inhibe el efecto de NGF en células PC12 al bloquear los residuos de ácido siálico del receptor a NGF. Este efecto puede también ser el responsable de la inhibición en el crecimiento de

neuronas sensoriales observado en nuestros experimentos, debido a que el tipo celular es dependiente de NGF para su crecimiento (Levi-Montalcini, 1987).

El mecanismo por medio del cual la Con A en solución estimula el crecimiento neurítico es aún desconocido. Sin embargo, sabemos que existe una internalización del complejo receptor-lectina a nivel de las fibras nerviosas y una vez internalizado, el complejo se transporta hacia el cuerpo celular en forma de pequeños grupos que se acumulan alrededor del núcleo (Koda y Parlow, 1976; Carbonetto y Argon, 1980). La redistribución de receptores de Con A intervienen en los fenómenos de adhesión al sustrato y de crecimiento de fibras. La Con A modifica el movimiento lateral de los receptores membranales en función del tipo celular (Henis y Elsen, 1981). Interviene a nivel de la superficie celular, estimulando una serie de complejos eventos como: la adhesión, el crecimiento, etc. (De George y cols., 1985) aumentando la secreción y la acumulación de glucosaminoglicanos (Locci y cols., 1990) y de proteoglicanos (Evangelisti y cols., 1984) y la actividad exoglucosidasa (Bodo y cols., 1988). Los sitios preferentes de unión intracelular de la Con A en neuroblastoma son las prolongaciones neuríticas y el soma (Hart y Wood, 1985; 1986). Así, podemos concluir que la Con A ejerce su acción a nivel membranar en un primer tiempo y la nueva información celular se expresa después como cambios en el crecimiento neural (como vimos en nuestro resultado en modificaciones en la ocupación espacial y de la forma de la célula).

Los mecanismos de acción de otras lectinas no han sido estudiados. Sin embargo, el papel de los grupos galactosa se encuentra en estudio en múltiples sistemas nerviosos (Milos y Wilson, 1986; Davies y cols., 1990; Yoshizaki, 1990) y no neuronales (Davenport y cols., 1987; Trinkaus-Randal y cols., 1988; Draaijer y cols., 1989). En células musculares la adhesión a laminina se ve disminuida en presencia de ciertas lectinas vegetales, las cuáles bloquean la interacción de la laminina con su integrina (Cooper y cols., 1991). Este efecto es interpretado como un efecto competitivo de la unión laminina-integrina de los sitios glucosilados de éstas, los cuales son reconocidos por las lectinas exógenas.

En células del epitelio intestinal de ratón se observa que la lectina UeAf se internaliza rápidamente por un proceso de endocitosis y dentro de la célula provoca cambios morfológicos especialmente en las microvellosidades y en la distribución de la actina polimerizada (Clark y cols., 1995). Un análisis del citoesqueleto de neuronas sensoriales en presencia de UeAf es necesario de realizar para observar un efecto similar al descrito para las células epiteliales.

La lectina endógena L14 modula la interacción entre la célula y la matriz extracelular en especial con su reconocimiento a fragmentos de laminina. Esta acción es dependiente de la concentración, ya que a bajas concentraciones aumenta la afinidad de la unión de la lectina divalente al sustrato polivalente, pero a altas concentraciones se observa una disminución en la afinidad debido a una disrupción de las uniones divalentes que quedan con subunidades sin

ligandos (Massa y cols., 1993). Un efecto en la cooperatividad como el de laminina y L14 pudiera ocurrir para otras lectinas endógenas o exógenas.

A pesar de los pocos trabajos experimentales, una nueva línea de investigación se encuentra en desarrollo con el fin de definir el papel y la importancia de la inhibición del crecimiento (Patterson, 1988). Así, Verna (1985) puso en evidencia un factor secretado por la epidermis que provoca un cambio de dirección de las fibras nerviosas, sin que estas entren en contacto directo con la epidermis. Años después, Fichard (1989) mostró que el factor que provoca esta reacción es un proteoglicano a condronictina sulfato. Estos resultados muestran el papel de los compuestos de la matriz extracelular en los fenómenos de adhesión y de repulsión celular.

Perspectivas

Los nuevos avances en Glucobiología muestran una amplia distribución de los sacáridos en biomoléculas. Estos compuestos no solo forman parte de la estructura de las moléculas, sino que su presencia y variación espacio-temporal le aportan una función en procesos tan diversos como el reconocimiento, la adhesión y el crecimiento. Estos variados procesos biológicos involucran tanto a las moléculas glucosiladas como a las proteínas que son capaces de su reconocimiento: las lectinas.

Día con día se describen más moléculas con funciones de tipo lectina y sus correspondientes ligandos glucosilados. Varios de ellos pueden decirse que son nuevos, pero otro gran número, son compuestos supuestamente conocidos con anterioridad. Así, las citocinas y los factores de crecimiento se consideraban moléculas con receptores estrictamente proteicos. Se sabe que cuando una citocina se une a su receptor, el dominio intracelular se fosforila, pero esta fosforilación no se ha podido explicar simplemente por la oligomerización de la citocina ya que frecuentemente estos dominios intracitoplásmicos no tienen actividad cinasa. Entonces, se propone que la fosforilación se debe a una cinasa que se encuentra asociada con otra parte del complejo receptor de superficie y corresponde al dominio de reconocimiento a carbohidratos presente en las citocinas (Zanetta y cols., 1996). Es decir, las citocinas son en una parte lectinas.

Los factores de crecimiento al igual que las citocinas poseen dos dominios de reconocimiento diferente. El primero de ellos es el dominio clásico de unión al receptor que incluye frecuentemente las secuencias amino y carboxi terminales. El segundo dominio se localiza en la parte opuesta al sitio de unión al receptor y de forma similar a las citocinas corresponde a un segmento con función lectina (Wells y cols., 1994).

Entre las moléculas novedosas con funciones de lectina Tsui y colaboradores (1996) describen a la proteína Narp como una lectina dependiente

de calcio del tipo pentraxina. El RNA mensajero para Narp se encuentra abundantemente expresado en neuronas del cerebro en desarrollo y en la médula espinal de mamíferos. Narp promueve la migración y el crecimiento dendrítico de cierto tipo neuronal actuando como un compuesto soluble, pero a su vez su secreción es regulada rápidamente por la actividad de sinapsis funcionales.

En la glándula suprarrenal de rata se describió la presencia de una proteína capaz de inducir la liberación de dopamina en el mesencéfalo ventral, por tal motivo fué denominada Dopamine Releasing Protein (DARP) (Chang y Ramírez, 1988). Años más tarde esa misma proteína ha sido detectada en cerebro de rata (Choi y cols., 1994) y líquido cefalorraquídeo de pacientes con trastornos neurológicos (Verdugo-Díaz y cols., 1997). A pesar de no tener un dato experimental concluyente, por sus propiedades bioquímicas así como por sus características funcionales, se propone que DARP es una proteína de tipo lectina que pudiera actuar como un factor de crecimiento (Llano y Ramírez, 1994).

La expresión diferencial de carbohidratos en la superficie celular se ha usado extensivamente para distinguir entre grupos de neuronas en desarrollo y en neuronas maduras (Katz y cols., 1995). En el sistema nervioso periférico el patrón de glucosilación se correlaciona con el patrón de inervación y los neurotransmisores que se sintetizan (Dodd y Jessell, 1986, Jessell y cols., 1990, Regan y cols., 1986, Dodd y cols., 1988) indicando que se pueden usar como marcadores de poblaciones de neuronas sensoriales.

Por último las lectinas endógenas y sus receptores son moléculas que han sido relacionadas con varios estados patológicos tan variados como las neuroplastías de la espina dorsal de rata (Cameron y cols., 1993), el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Zanetta y cols., 1996), los adenocarcinomas (Song y cols., 1993), los procesos metastásicos (van den Brule y cols., 1995), etc. Varias de las diferencias entre células sanas y enfermas en tumores se han correlacionado con diferencias en la silación de los carbohidratos membranales (Song y cols., 1993).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio experimental nos permiten reportar las siguientes conclusiones:

- Las lectinas modifican el crecimiento de las neuronas sensoriales de embrión de pollo, tanto cuando son utilizadas como sustratos o agregadas en solución al medio de cultivo.
- La comparación de los efectos provocados por los diferentes sustratos de lectinas sobre el crecimiento de las fibras nerviosas nos permitió clasificar dos clases de lectinas. La primera de ellas comprende las lectinas que favorecen el desarrollo neuronal (Con A, LCA, PSA), lectinas que tienen todas ellas una mayor especificidad a glucosa-manosa. La segunda clase comprende las lectinas que al contrario de las anteriores, inhiben o retardan el crecimiento de las fibras nerviosas y que tienen distintas especificidades a glúcidos (WGA, PNA, UeAf. etc.).
- Los efectos de las lectinas en solución son dosis-dependientes y corresponden de forma general a la clasificación precedente.

Ciertos estudios realizados *in vitro* muestran que diversas lectinas vegetales utilizadas como sustrato de cultivo, modulan la adhesión y el crecimiento de las neuronas. Estas variaciones son producto de modificaciones en la organización del citoesqueleto, la cual depende de una cascada de eventos que tienen su punto de iniciación a nivel de la membrana plasmática. Así, se desprende la interrogante de saber si existen receptores específicos a las lectinas o si éstas utilizan los sitios de unión de otros receptores, como aquellos que rigen las interacciones entre células (CAM's caderinas, etc.) de células-matriz extracelular (integrinas) o de células y compuestos solubles. Sin embargo, cualquiera que sea el caso en el presente estudio realizado con el objetivo de observar el efecto de las lectinas sobre el crecimiento neurítico se muestra que la interacción de la neurona con su medio ambiente es fundamental en el comportamiento de esta en el desarrollo. Los cambios en el crecimiento no sólo se realizan variando la velocidad de elongación, sino que igualmente variando el número de neuritas y las ramificaciones formadas en las mismas, es decir cambiando la forma neuronal.

En el modelo experimental del cultivo celular se puede observar las diferentes etapas de crecimiento neurítico *in vitro* desde el fenómeno de adhesión hasta la distribución de componentes intracelulares como las proteínas del citoesqueleto. Sin embargo, queda abierta la interrogante del papel que juegan las lectinas endógenas en las diversas poblaciones neuronales y en la modulación de las diferentes etapas de su desarrollo. Esta gran incógnita se encuentra aún poco explorada pero estamos seguros que en poco tiempo empezará a ser resuelta y confirmará la hipótesis que sostenemos, la cual consiste en que la influencia de estas moléculas en combinación con otros compuestos, tanto solubles como de la matriz extracelular son los que definen la formación de las complicadas redes neuronales de los vertebrados en desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

-A-

ADLER, R. (1982). Regulation of neurite growth in purified retina neuronal cultures : effects of PNPf, a substratum-bound, neurite-promoting factor. J. Neurosci. Res., 8(2-3), 165-177.

ADLER, R., MANTHORPE, M., VARON, S. (1983). Lectin reactivity of PNPf, a polyornithine-binding neurite-promoting factor. Dev. Brain Res., 6, 69-75.

*ADLER, R., JERDAN, J., HEWITT, A.T. (1985). Responses of cultured neural retinal cells to substratum-bound laminin and other extra-cellular matrix molecules. Dev. Biol., 112 (1), 100-114.

*AKIMOTO, Y., OBINATA, A., HIRABAYASHI, J., SAKAKURA, Y., ENDO, H., KASAI, K-I., HIRANO, H. (1995). Changes in expression of two endogenous β -galactoside-binding isolectins in the dermis of chick embryonic skin during development *in ovo* and *in vitro*. Cell Tissue Res., 279, 3-12.

*AKIYAMA, S.K., NAGATA, K., YAMADA, K.M. (1990). Cell surface receptors for extracellular matrix components. Biochem. Biophys. Acta., 1031: 91-110.]

*ALROY, J., UCCI, A.A., PEREIRA, M.E.A. (1984). Lectins: Histochemical probes for specific carbohydrate residues. In "Advances in Immunohistochemistry", Debellis, R.A., ed., New York, 67-88.

*AMIEVA, M.R., FURTHMAYR, H. (1995). Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. Exp. Cell Res., 219, 180-196.

*APLIN, J.D., HUGHES, R.C. (1981a). Modification of fibroblast surface amines alters receptor-mediated cell spreading on protein-coated substrata but not adsorptive endocytosis. J. Cell Sci., 49, 283-297.

*APLIN, J.D., HUGHES, R.C. (1981b). Cell adhesion on model substrata: Threshold effects and receptor modulation. J. Cell. Sci., 50, 89-103.

APLIN, J.D., HUGHES, R.C. (1981c). Protein-Derivatized glass coverslips for the study of cell-to-substratum adhesion. Anal. Biochem., 113, 144-148.

ARENA, N., BODO, M., BARONI, T., ALIA, F.A., GASPA, L., BECCHETTI, E. (1990). Effects of lectins on cytoskeleton and morphology of cultured chick embryo fibroblasts. Cell Molec. Biol., 36 (3), 317-328.

*ARVANOV, V.L., TSAI, M-Ch., WALKER, R.J., AYRAPETIAN, S.N. (1993). Interaction of concanavalin A and a wheat germ agglutinin with Hellix acetylcholine receptors. Brain Res., 615, 252-258.

ASAMOTO, K., NOJYO, Y., AOYAMA, H. (1990). Do peanut agglutinin receptors on somites control the behavior of neural cells? Dev. Growth & Differ., 32 (1), 91-96.

*ASH, J.F., SINGER, S.J. (1976). Concanavalin A-induced transmembrane linkage of concanavalin A surface receptors to intracellular myosin-containing filaments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 (12), 4575-4579.

ASHWELL, G., HARFORD, J. (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. Ann. Rev. Biochem., 51, 531-554.

ASHWELL, G., MORELL, A.G. (1974). The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv. Enzymol. Relat Areas Mol. Biol., 41, 99-128.

- B -

*BADLEY, R.A., WOODS, A., REES, D.A. (1981). Cooperativity of Concanavalin A patching and its influence on cytoskeleton changes in fibroblast rounding and detachment. J. Cell Sci., 47, 349-363.

*BARDE, Y.A. (1988). What if anything is a neurotrophic factor?. TINS, 11 (8), 343-345.

*BARDE, Y.A., EDGAR, D., THOENEN, H., (1983). New neurotrophic factors. Ann Rev. Physiol., 45, 601-612.

*BARDE, Y.A., EDGAR, D., THOENEN, H., (1987). Neurotrophic factor in the central nervous system. In "Brain Peptides update", ed. Martin, J., Brownstein, M., and Ksieger, D., Vol. 1, 240-247.

*BARONDES, S.H. (1984). Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. Science, 223, 1259-1264.

*BARONDES, S.H. (1988). Bifunctional properties of lectins: lectins redefined Trends Biochem. Sci., 13, 480-482.

*BARONDES, S.H., HAYWOOD-REID, P.L. (1981). Externalization of an endogenous chicken muscle lectin with in vivo development. J. Cell Biol., 91, 568-572.

*BARONDES, S.H., COOPER, D.N.W., GITT, M.A., LEFFLER, H. (1994). Galectins. J. Biol. Chem., 269 (33), 20807-20810.

*BARONDES, S.H., CASTRONOVO, V., COOPER, D.N.W., CUMMINGS, R.D., DRICKAMER, K., FEIZI, T., GITT, M.A., HIRABAYASHI, J., HUGHES, C., KASAI, K-I., LEFFLER, H., LIU, F-T., LOTAN, R., MERCURIRO, A.M., MONSIGNY, M., PILLAI, S., POIRER, F., RAZ, A., RIGBY, P.W.J., RINI, J.M., WANG, J.L. (1994). Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. Cell, 76:597-598.

BASU, S., GUPTA, G., CHOWDHURY, G., MAHAJAN, R.G. (1997). Novel 29 kDa heparin-binding lectin from human foetal brain. Int. J. Devl. Neuroscience. 18(1): 113-125.

*BAUER, H.C., TONTSCH, U. (1990). Glial-conditioned medium and attachment to Con A are essential for long-term culture of cortical neuron. Int. J. Dev. Neurosci., 8 (2), 151-158.

*BEE, J.A. (1982). A cytochemical study of lectin receptors on isolated chick neural retina neurons *in vitro*. J. Cell Sci., 53, 1-20.

*BEGOVIAC, P.C., HALL, D.E., SHUR, B.D. (1991). Laminin fragment E8 mediates PC12 cell neurite outgrowth by binding to cell surface β 1,4 galactosyltransferase. J. Cell Biol., 113 (3), 637-644.

*BEGOVIAC, P.C., SHUR, B.D. (1990). Cell surface galactosyltransferase mediates the initiation of neurite outgrowth from PC12 cells on laminin. J. Cell Biol., 110, 461-470.

*BERESZOVSKAYA, O.L., MARES, V., SKIBO, G.G. (1995). Growth related changes in sugar determinants on the surface of C6 glioma cells in culture: a cytochemical lectin-binding study. J. Neurosc. Res., 42: 192-198.

BIAGIONI, S., OCBRISIO, T., POIANA, G., SCARSELLA, G., AUGUSTI-TOCCO, G. (1989). Acetylcholinesterase in the development of chick dorsal root ganglia. Int. J. Dev. Neurosci., 7 (3), 267-273.

BIZET, M.C. (1984). Analyse dynamique multifactorielle de la croissance de neurones ganglionnaires spinaux cultivés in vitro sur divers substrats. Thèse du 3eme. cycle, Biologie Cellulaire, Université Scientifique et Médicale de Grenoble.

BLANK Y COLS. (1996). ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL LECTINAS PAG 13

*BODO, M., PEZETTI, F., BECCHETTI, E., ORLACCHIO, A., EVANGELISTI, R., CARINCI, P. (1988). Age related and lectin influenced changes of exoglycosidases activity in cultured chick embryonic skin fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep., 12 (6), 459-464.

*BOTTENSTEIN, J.E., SPAKER, S.D., VARON, S.D., SATO, G.H. (1980). Selective survival of neurons from chick embryo sensory ganglionic dissociates utilizing serum-free supplemented medium. Exp. Cell Res., 125, 183-190.

BOURGUIGNON, L.Y.W., BOURGUIGNON, G.J. (1984). Capping and the cytoskeleton. Inter. Rev. Cytol., 87, 195-224.

BOURGUIGNON, L.Y.W., ROSEK, R.J. (1980). Capping of Concanavalin A receptors and their association with microfilaments in monolayer grown human fibroblastoid cells. Cell Tissue Res., 205, 77-84.

*BOYD, W.G., SHAPLEIGH, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science, 119, 419.

*BRAY, D. (1987). Growth cones do they pull or are they pushed? TINS, 10 (10), 431-434.

*BRAY, D., CHAPMAN, K. (1985). Analysis of microspike movements on the neural growth cone. J. Neurosci., 5, 3204-3213.

BRAY, D., BUNGE, M.B., CHAPMAN, K. (1987). Geometry of isolated sensory neurons in culture. Effects of embryonic age and culture substratum. Exp. Cell Res., 168, 127-137.

*BRAY, D., HOLLENBECK, P.J. (1988). Growth cone motility and guidance. Rev. Cell Biol., 4, 43-61.

BRYAN, F., MANLY, J. (1986). Multivariate Statistical Methods A. Primer ed; Chapman and Hall, London, 159 p.

*BURGER, M.M., BURKART, W., WEINBAUM, G., JUMBLALT, J. (1978). Cell-cell recognition: Molecular aspects: Recognition and its relation to morphogenetic process in general. In: Cell-cell recognition Vol XXXII (A. Curtis, ed.) Cambridge Press, 1-24.

- C -

CAI, D., WEBBER, M.M., De LUCA, L.M. (1991). Retinoids enhance lectin binding to gp 130, a glycoprotein of NIH-3T3 cells: correlation with cell growth and adhesion. Exp. Cell Res., 192, 366-372.

*CALOFF, A.L., LANDER, A.D. (1991). Relationship between neuronal migration and cell-substratum adhesion: laminin and merosin promote olfactory neuronal migration but are anti-adhesive. J. Cell Biol., 115(3), 779-794.

*CAMERON, A.A., DOUGHERTY, P.M., GARRISON, Ch.J., WILLIS, W.D., CARLTON, S.M. (1993). The endogenous lectin RL-29 is transynaptically induced in dorsal horn neurons following peripheral neuropathy in the rat. Brain Res., 620, 64-71.

*CARBONETTO, S. (1984). The extracellular matrix of the nervous system. TINS., 7(10), 382-387.

*CARBONETTO, S., ARGON, Y. (1980). Lectins induce the redistribution and internalization of receptors on the surface of cultured neurons. Dev. Biol., 80, 364-378.

*CARBONETTO, S., COCHARD, P. (1987). In vitro studies on the control of nerve fiber growth by the extracellular matrix of the nervous system. J. Physiol. Paris., 92, 258-270.

*CARBONETTO, S., DOUVILLE, D., HARVEY, W., TURNER, D.C. (1988). Laminin, fibronectin, collagen and their receptors in nerve fiber growth. Curr. Iss. Neur. Regeneration Res., 147-158.

*CARON, M., BLADIER, D., JOUBERT, R. (1990). Soluble galactoside-binding vertebrate lectins: a protein family with common properties. Int. J. Biochem., 22(12): 1379-1385.

*CARONI, P., SCHWAB, M. (1988). Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. J. Cell. Biol., 106, 1281-1288.

*CARTER, W.G., RAUVALA, H., HAKOMORI, S-I. (1981). Studies on cell adhesion and recognition II. The kinetics of cell adhesion and cell spreading on surfaces coated with carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and fibronectin: J. Cell Biol., 88, 138-148.

CODOGNO, P., BOTTI, J., FONT, J., AUBERY, M. (1985). Modification of the N-linked oligosaccharides in cell surface glycoproteins during chick embryo development. A using lectin affinity and a high resolution chromatography study. Eur. J. Biochem., 149, 453-460.

*CODOGNO, P., DOYENNETTE-MOYNE, M.A., BOTTI, J., AUBERY, M. (1988). Concanavalin A-induced impairment of fibroblast spreading on laminin but not on fibronectin. J. Cell Physiol., 136, 463-470.

COLLINS, F., (1978a). Axon initiation by ciliary neurons in culture. Dev. Biol., 65, 50-57.

COLLINS, F. (1978b). Induction of neurite outgrowth by conditioned medium factor bound to the culture substratum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 5210-5213.

*COLLINS, F., LEE, M.R. (1984). The spatial control of ganglionic neurite growth by substrate-associated material from conditioned medium: An experimental model of haptotaxis. J. Neurosci., 4(11), 2823-2929.

*CONDEELIS, J. (1979). Isolation of Concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin. J. Cell Biol., 80, 751-758.

*COOPER, D.N.W., MASSA, S.M., BARONDES, S.H. (1991). Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. J. Cell Biol., 115(5), 1437-1448.

CRAIK, J.D., CAROTHERS CARRAWAY, C.C., CARRAWAY, K.L. (1985). Transmembrane modulation of the Concanavalin A inhibition of 5'-nucleotidase is not due to a direct association of the enzyme with the cytoskeleton. Bioch. Biophys. Acta., 845, 27-33.

*CRAIN S.M., PETERSON, E.R. (1982). Selective innervation of target regions within fetal mouse spinal cord and medulla explants by isolated dorsal root ganglia in organo-typic co-cultures. Dev. Brain Res., 2, 341-362.

CURRIE, J. R., MAYLIE-PFENNINGER, M. F., PFENNINGER, K. H. (1984). Developmentally regulated plasmalemmal glycoconjugates of the surface and neural ectoderm. Dev. Biol., 106, 109-120.

- Ch -

CHADLI, A., LeCAER, J-P., BLADIER, D., JOUBERT-CARON, R., CARON, M. (1997). Purification and characterization of a human brain galectin-1 ligand. J. Neurochem., 68: 1640-1647.

CHAMAK, B., PROCHIANTZ, A. (1989). Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity. Development, 106, 483-491.

*CHANG, S., RATHJEN, F.G., RAPER, J.A. (1987). Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. J. Cell Biol., 104, 355-362.

*CHANG, G.D., RAMIREZ, V.D. (1988). A potent dopamine-releasing factor is present in high concentrations in the rat adrenal gland. Brain Res., 463, 385-389.

*CHIGUET, M., ACKLIN, S.E. (1986). Attachment to Con A or extracellular matrix initiates rapid sprouting by cultures leech neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6188-6192.

*CHO, W.S., KIM, M-O, RAMIREZ, V.D. (1994). Immunocytochemical mapping of a novel dopamine-releasing protein in the rat brain. Neuroendocrinology, 60, 194-204.

- D -

*DAVENPORT, K., MAHAN, J.T., DONALDSON, D.J. (1987). Role of carbohydrates in cell-substrate interactions during newt epidermal cell migration. J. Exp. Zool., 243, 461-471.

*DAVIES, A.M. (1988). Role of neurotrophic factors in development. Trends Genet., 4(5), 139-143.

*DAVIES, J.A., COOK, G.M.W., STERN, C.D., KEYNES, R.J. (1990). Isolation from chick somites of a glycoprotein fraction that causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. Neuron, 2, 11-20.

DEAN III, J.W., CHANDRASEKARAN, S., TANZER, M.L. (1988) Lectins inhibits cell binding and spreading on a laminin substrate. Biochem. Biophys. Res. Commun., 156 (1), 411-416.

*DE GEORGE, J.J., CARBONETTO, S. (1986). Wheat germ agglutinin inhibits nerve fiber growth and concanavalin A stimulates nerve fiber initiation in cultures of dorsal root ganglia neurons. Dev. Brain Res., 28, 169-175.

*DE GEORGE, J.J., CARBONETTO, S. (1987). Specificity and valency of concanavalin A in neuron-substratum adhesion and redistribution of cell surface receptors. Dev. Biol., 119, 45-58.

*DE GEORGE, J.J., SLEPECTY, N., CARBONETTO, S. (1985). Concanavalin A stimulates neuron-substratum adhesion and nerve fiber outgrowth in culture. Dev. Biol., 111, 335-351.

*DeGRAUW, T.J., LUWNICE, B.H. (1986). Lectins are markers of neuronal migration and differentiation in rat brain. Dev. Neurosc. ISSN, 8(4), 236-242.

*DODD, J., JESSELL, T.M. (1986). Cell surface glycoconjugates and carbohydrate binding proteins: possible recognition signals in sensory neurone development. J. Exp. Biol., 124, 225-238.

*DODD, J., MORTON, S.B., KARAGOGEOS, D., YAMAMOTO, M., JESSELL, T.M. (1988). Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. Neuron, 1, 105-116.

*DODD, J., JESSELL, T.M.(1988). Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. Science, 242(4879), 692-699.

*DONALDSON, D.J., MAHAN, J.T. (1984). Inability of *Newt* epidermal cells to migrate over concanavalin A-coated substrates. J. Exp. Zool., 231, 211-219.

DONTENWILL, M., ROUSSEL, G., ZANETTA, J.P. (1985). Immunohistochemical localization of a lectin-like molecule, R1, during the postnatal development of the rat cerebellum. Dev. Brain Res., 17, 245-252.

*DRAAIJER, M., KONINKX, J., HENDRIKS, H., KIK, M., VAN DIJK, J., MOUWEN, J. (1989). Actin cytoskeletal lesions in differentiated human colon carcinoma Caco-2 cells after exposure to soybean agglutinin. Biol. Cell, 65, 29-35.

*DRICKAMER, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. J.Biol. Chem., 263: 9557-9560.

*DRICKAMER, K. (1993). Ca²⁺- dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins. Curr. Opin. Struct. Biol., 3, 393-400.

*DRICKAMER, K. (1995). Increasing diversity of animal lectin structures. Curr. Opin. Struct. Biol., 5, 612-616.

DUVAL, J.L., SIGOT-LUIZARD, M.F., SIGOT, M. (1986). Studies of endothelial cells adhesion to glutaraldehyde or carbodiimide cross-linked proteins. Biological and Biomechanical Performance of Biomaterials, Ed. P. Chritel, A. Meunier, A.J.C. Lee, Amsterdam, 269-274.

- E -

*EDELMAN, G.M. (1976). Surface modulation in cell recognition and cell growth. Science, 192, 218-226.

*EDELMAN, G.M. (1984). Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration. Exp. Cell Res., 161:1-16.

*EDELMAN, G.M. (1985). Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. Ann. Rev. Biochem., 54, 135-169.

*EISEN, J. S. (1988). Growth cone guidance and pathway formation. TINS, 11, 8(122), 333-335.

ENGEL, J. (1996). Domain organizations of modular extracellular matrix proteins and their evolution. Matrix Biol., 1(15): 295-299.

*ENGVALL, E., EARWICKER, D., DAY, A., MUIR, D., MANTHORPE, M., PAULSSON, M., (1992). Merosin promotes cell attachment and neurite outgrowth and is a component of the neurite-promoting factor of RN22 Schwannoma cells. Exp. Cell Res., 198, 115-123.

ERBE, J. V., WOLITZKY, B. A. , PRESTA, L. G., NORTON, C. R., RAMOS, R. J., BURNS, D. K., RUMBERGER, J.M., NARASINGA RAO, B.N., FOXALL, C. BRANDLEY, B.K., LASKY, L. A. (1992). Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. J. Cell Biol., 119 (1), 215-227.

ERBE, D. V., WATSON, S. R., PRESTA, L. G., WOLITZKY, B. A., FOXALL, C. BRANDLEY, B.K., LASKY, L. A. (1993). P-and E- selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. J. Cell Biol., 120 (5), 1227-1235.

ERSKINE, L., STEWART, R., McCAIG, C.D. (1995). Electric field-directed growth and branching of cultured frog nerves: effects of aminoglycosides and polycations. J. Neurobiol., 26(4), 523-536.

*EVANGELISTI, R., BODO, M., CARUSO, A., BECCHETTI, E., CARINCI, P. (1984). Extracellular glycosaminoglycans (GAG) released by chick embryonic fibroblasts. Cell Tissue Res., 238, 241-245.

- F -

*FABIAN, R.H., COULTER, J.D. (1985). Transneuronal transport of lectins. Brain Res., 344, 41-48.

FAISSNER, A., STEINDLER, A. (1995). Boundaries and inhibitory molecules in developing neural tissues. Glia., 13, 233-254.

*FICHARD, A. (1989). Analyse in vitro de l'innervation epidermique chez l'embryon d'oiseau: caracterisation d'un facteur chimiotactique negatif implique dans la reaction d'evitement de l'epiderme par les fibres nerveuses. These Docteur de l'Universite Joseph Fourier, Grenoble I.

*FINDLAY, D.R., NEWMYER, D.D., PRICE, T.M., FORBES, D.J. (1987). Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. J. Cell Biol., 104, 189-200.

*FIEDLER, K. SIMONS, K. (1994). A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins. Cell, 77, 625-626.

FINNE, J., KRUSIUS, T. (1982). Preparation and fractionation of glycopeptides. Meth. in Enzym., 83, 269-277.

*FOX, N., DAMJANOU, I., MARTINEZ-HERNANDEZ, A., KNOWLESS, B.B., SOLTER, D. (1981). Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal adult tissues. Dev. Biol., 83(2), 391-398.

*FRAKIER, P.J., SPECK, J.C. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a, 6a-diphrenylglycoluril. Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 849-857.

FUKUCA, M. (1995). Carbohydrate-dependent cell adhesion. Bioorganic Medicinal Chem., 3(3), 207-215.

- G -

*GABIUS, H-J. (1997). Detection and functions of mammalian lectins - with emphasis on membrane lectins. Biochimica et Biophysica Acta, 1071, 1-18.

*GABIUS, H-J. (1997). Animal lectins. Eur. J. Biochem., 243: 543-576.

*GAHMBERG, C.G., TOLVANEN, M. (1996). Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. TIBS, 21: 308-311.

GIPSON, I.K., ANDERSON, R.A. (1980). Effect to lectins on migration of the corneal epithelium. Inv. Ophth. Vis. Sci. 19(4), 341-349.

GLASER, E.M., TAGAMENTS, M., McMULLEN, N.T., Van der LOOS, H. (1983). The image-combining computer microscope -an interactive instrument for morphometry of the nervous system. J. Neurosc. Meth., 8, 17-32.

GOLDBERG, D.J., BURMEISTER, D.W. (1988). Growth cone movements. TINS, 11(6), 257-258.

*GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. (1980). What should be called a lectin? Nature (London), 285, 66.

*GOODMAN, C.S., RAPER, J.A., HO, R.K., CHANG, S. (1982). Developmental order: its origin and regulation (Sublenly, S. and P.B. Green, eds); Alan Liss, 275-316.

*GORDON-WEEKS, P.R. (1989). GAP-43 - What does it do in the growth cone? TINS, 12 (10), 363-365.

*GREENBERG, L.M., PFENNINGER, K.H. (1986). Membrane glycoproteins of the nerve growth cone: diversity and growth regulation of oligosaccharides. J. Cell Biol., 103, 1369-1382.

*GRUMBACHER-REINERT, S. (1989). Local influence of substrate molecules in determining distinctive growth patterns of identified neurons in culture. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86 (18), 7270-7274.

- H -

*HAKOMORI, H. (1981). glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. Ann. Rev. Biochem., 50, 733-764.

*HANKINS, C.N., KINDERGER, J.I., SHANON, L.M. (1980). Legume α -galactosidases which have hemagglutinin properties. Plant Physiol., 65, 618-622.

*HANKINS, C.N., SHANON, L.M. (1978). The physical and enzymatic properties of a phytohemagglutinin from mung beans. J. Biol. Chem., 253, 7791-7797.

*HARRIS, W.A., HOLT, C.E., BONHOEFFER, F. (1987). Retinal axons with and without their somata growing to an arborizing in the tectum of *Xenopus* embryos: time-lapse video study of single fibres *in vivo*. Development, 101, 123-133.

*HARRISON, F.L. (1991). Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. J. Cell Sci., 100, 9-14.

*HART, C.E., WOOD, J.G. (1985). A comparative study of the intracellular lectin binding sites of neurons in culture with neurons *in situ*. J. Comp. Neurol., 239, 155-162.

*HART, C.E., WOOD, J.G. (1986). Analysis of the carbohydrate composition of axonally transported glycoconjugates in sciatic nerve. J. Neurosci., 6(5), 1365-1371.

*HASHIMOTO, S., HAGINO, A. (1989). Wheat germ agglutinin, Concanavalin A, and Lens Culinalis Agglutinin block the inhibitory effect of nerve growth factor on cell-free phosphorylation of Nsp 100 in PC 12h cells. Cell. Struct. Funct. 14, 87-93.

*HATTEN, M.E., FRANCOIS, A.M. (1981). Adhesive specificity of developing cerebella cells of lectin substrata. Dev. Biol., 87, 102-113.

*HAY, E.D. (1981). Cell biology of Extracellular Matrix Ed. Plenum, New York, 379 p.

*HENIS, Y.I., ELSEN, E.L. (1981). Differences in the response of several cell types to inhibition of surface receptor mobility by local Concanavalin A binding. Exp. Cell Res.; 136, 189-201.

*HIRABAYASHI, J., KASAI, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. Glycobiology, 3(4), 297-304.

*HOFFMAN, P.N., LASEK, J.R. (1980). Characteristics of norepinephrine uptake in developing peripheral nerve terminals. Brain Res., 202, 317-333.

*HORST, C. J., FORESTNER, D.M., BESHARSE, J.C. (1987). Cytoskeletal-membrane interactions: a stable interaction between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium. J. Cell Biol., 105 (6), 2973-2987.

HOUNSGAARD, J., MIDTGAARD, J. (1989). Dendrite processing in more ways than one. TINS, 12(9), 135, 313-314.

*HUCK, S., HATTEN, M.E. (1981). Developmental stage-specific changes in lectin binding to mouse cerebella in vitro. J. Neurosci., 1 (10), 1075-1084.

- I -

*ISENBERG, G., SMALL, J.V., KREUTZBERG, G.W. (1978). Correlation between actin polymerization and surface receptor segregation in neuroblastoma cells treated with Concanavalin A. J. Neurocyt., 7, 649-661.

- J -

JAFFE, S.H., FRIEDLANDER, D.R., MATSUZAKI, F., CROSSIN, K.L., CUNNINGHAM, B.A., EDELMAN, G.M. (1990). Differential effects of the cytoplasmic domains of cell adhesion molecules on cell aggregation and sorting-cut. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 87, 3589-3593.

*JESSELL, T.M., HYNES, M.A., DODD, J. (1990). Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. Ann. Rev. Neurosci., 13, 227-255.

JONES, G.E., ARUMUGHAM, R.G., TANZER, M.L. (1986). Fibronectin glycosylation modulates fibroblast adhesion and spreading. J. Cell Biol., 103, 1663-1670.

*JOUS MAA, J., MERENMIES, J., RAUVALA, H. (1984). Neurite outgrowth of neuroblastoma cells induced by proteins covalently coupled to glass coverslips. Eur. J. Cell Biol., 35, 55-61.

*JUNG G., HELM, R.M., CAROTHERS CARRAWAY, C.C., CARRAWAY, K.L. (1984). Mechanism of Concanavalin A-induced anchorage of the major cell surface glycoproteins to the submembrane cytoskeleton in 13762 ascites mammary adenocarcinoma cells. J. Cell Biol., 98, 179-187.

- K -

*KATAYAMA, N., YAMAGATA, Y., HASHIMOTO, H., KANAZAWA, H., TSUCHIYA, T., TSUDA, M. (1990). Concanavalin A affects beta-tubulin mRNA expression during neuritic processes of mouse neuroblastoma N18TG2 cells in a different manner from colchicine. Biochem. Biophys. Res. Commun., 167(3), 1348-1354.

*KATER, S.B., MATTSON, M.P., COHAN, CH. CONNOR, J. (1988). Calcium regulation of the neuronal growth cone. TINS, 11(7), 315-321.

*KATZ, D.M., WHITE, M.E., HALL, A.K. (1995). Lectin binding distinguishes between neuroendocrine and neuronal derivatives of the sympathoadrenal neural crest. J. Neurobiol., 26(2), 241-252.

*KAWASAKI, T., ASHWELL, G. (1976). Chemical and physical properties of an hepatic membrane protein that binds asialoglycoproteins. J. Biol. Chem., 251, 1296-1302.

KEYNES, R., COOK, G. (1990). Cell-cell repulsion: clues from the growth cone? Cell, 62, 609-610.

*KITAMURA, K. (1980). Changes in lectin activity during the development of the embryonic chick skin. J. Embryol. Exp. Morphol., 59, 59-69.

*KODA, L.Y., PARTLOW, L.M. (1976). Membrane marker movement on sympathetic axons in tissue culture. J. Neurobiol., 7(2), 157-172.

KOLBINGER, W., WARCHOL, W. (1993). An inexpensive computer-aided morphometric device for the analysis of dissociated brain cell cultures. Compt. Meth. Programs. Biomed. 40, 3-6.

*KOLIBER, D., BARONDES, S.H. (1977). Lectin activity from embryonic chick brain, heart and liver. Changes with development. Dev. Biol., 60, 326-330.

*KOLIBER, D., BARONDES, S.H. (1979). Lectin from embryonic chick muscle that interacts with glycosaminoglycans. FEBS Lett., 101, 257-261.

*KOLIBER, D., BEYER, R.C., BARONDES, S.H. (1978). Developmentally regulated lectins from chick muscle, brain and liver have similar chemical and immunological properties. Dev. Biol., 64, 265-272.

*KOMANO, H., NOZAWA, R., MIZUNO, D., NATORI, S. (1983). Measurement of *Sarophaga peregrina* lectin under various physiological conditions by radioimmunoassay. J. Cell Chem., 258, 2143-2147.

KRULL, C.E., COLLAZO, A., FRASER, S.E., BRONNER-FRASER, M. (1995). Segmental migration of trunk neural crest: time-lapse analysis reveals a role for PNA-binding molecules. Development, 121: 3733-3743.

*KRYSTOSEK, A. (1982). Cytoplasmic and extracellular control of neurite formation. In: The cytoskeleton in cell differentiation and development. Eds. Maccioni, R.B., and Arechaga, J. IRL Press, Oxford. 209-220.

*KUCHLER, S., FRESSINAUD, C., SARLIEVE, L.L., VICENDON, G., ZANETTA, J.P. (1988). Cerebellar soluble lectin is responsible for cell adhesion and participates in myelin compaction in cultured rat oligodendrocytes. Dev. Neurosci., 10, 199-212.

*KUCHLER, S., PERRAUD, F., SENSENBRENNER, M., VICENDON, G., ZANETTA, J.P. (1989). An endogenous lectin found in rat astrocyte cultures has a role in cell adhesion but not in cell proliferation. Glia, 2, 437-445.

- L -

*LAGARDE de J. (1983). Initiation à l'analyse des données. Ed; Dunod, BORDAS, Paris, 157 p.

*LAMB-WHARTON, R.J., MORGAN, W.T. (1993). Induction of T-Lymphocyte adhesion by histidine-proline rich glycoprotein and Concanavalin A. Cell Immun., 152, 544-555.

*LANDER, A.D. (1989). Understanding the molecules of neuronal cell contacts: emerging patterns of structure and functions. TINS, 12 (5), 189-193.

*LANDER, A.D., FUJII, D.K., GOSPODAROWICZ, D., REICHARDT, L.F. (1982). Characterization of a factor that promotes neurite outgrowth : evidence linking activity to a heparan sulfate proteoglycan. J. Cell Biol., 94, 574-585.

*LANDER, A.D., TOMASELLI, K., CALOF, A.L., REICHARDT, L.F. (1983). Studies on extracellular matrix components that promote neurite outgrowth. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. XLVIII, 611-623.

*LANDRETH, G.E., WILLIAMS, L.K., McCUTCHEN, C. (1985). Wheat germ agglutinin blocks the biological effects of nerve growth factor. J. Cell Biol., 101, 1690-1694.

*LANKFORD, K.L., LETOURNEAU, P.C. (1989). Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulation the stability of actin filaments. J. Cell Biol., 109, 1229-1243.

*LAVAIL, F.H., SUGINO, I.K., McDONALD, D.M. (1983). Localization of axonally transported 125I-wheat germ agglutinin beneath the plasma membrane of chick retinal ganglion cells. J. Cell Biol., 96, 373-381.

LAZARIDES, E. (1980). Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. Nature, 283, 249-257.

*LEHMANN, S., KUHLER, S., THEVENIAU, M., VINCENDON, G., ZANETTA, J.P. (1990). An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 6455-6459.

*LETCURNEAU, P.C. (1975). Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. Dev. Biol., 44, 92-101.

*LETOURNEAU, P.C. (1979a). Cell-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation. Exp. Cell Res., 124, 127-138.

*LETOURNEAU, P.C. (1979b). Inhibition of intercellular adhesion by concanavalin A is associated with Concanavalin A-mediated redistribution of surface receptors. J. Cell Biol., 80, 128-140.

*LETOURNEAU, P.C. (1981). Immunocytochemical evidence for colocalization in neurite growth cones of actin and myosin and their relationship to cell-substratum adhesion. Dev. Biol., 85, 113-125.

*LETOURNEAU, P.C. (1982). Analysis of microtubule number and length in cytoskeletons of cultured chick sensory neurons. J. Neurosci., 2 (6), 806-814.

*LETOURNEAU, P.C. (1983a). Axonal growth and guidance. TINS, 6 (11), 451-455.

*LETOURNEAU, P.C. (1983b). Differences in the organization of actin in the growth cones compared with the neurites of cultured neurons from chick embryos. J. Cell Biol., 97, 963-973.

*LETOURNEAU, P.C. (1987). What happens when growth meet neurites : attraction or repulsion? TINS, 10 (112), 390-392.

*LETOURNEAU, P.C., CONDIC, M.L., SNOW, D.M. (1992). Extracellular matrix and neurite outgrowth. Curr. Opin. Genetics Dev., 2: 625-634.

*LETOURNEAU, P.C., PEECH, T.V., ROGERS, S.L., PALM, S.L., McCARTHY, J.B., FURCHT, L.T. (1988). Growth cone migration across extracellular matrix components depends on integrin, but migration across glioma cells does not. J. Neurosci. Res., 21, 286-297.

*LETOURNEAU, P.C., RESSLER, A.H. (1984). Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. J. Cell Biol., 98, 1355-1362.

*LETOURNEAU, P.C., SHATTUCK, T.A. (1989). Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. Development, 105, 505-519.

*LETOURNEAU, P.C., SHATTUCK, T.A., RESSLER, A.H. (1986). Branching of sensory and sympathetic neurites *in vitro* is inhibited by treatment with taxol. J. Neurosci., 6(7), 1912-1917.

*LETOURNEAU, P.C., SHATTUCK, T.A., RESSLER, A.H. (1987). "Pull" and "Push" in neurite elongation observations on the effects of different concentrations of cytochalasin B and taxol. Cell Motil. & Cytos., 8, 193-209.

*LETOURNEAU, P.C., WESSELLS, N.K. (1974). Migratory cell locomotion versus nerve axons elongation. J. Cell Biol., 61, 56-69.

LEVI-MONTALCINI, R., ANGELETTI, P.V. (1968). Nerve growth factor. Physiol. Rev., 48, 534-569.

*LEVI, G., TEICHBERG, V.I. (1989). Patterns of expression of a 15K-D-galactoside-specific lectin during early development of the avian embryo. Development, 107, 909-921.

*LIENIER, I.E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I.J., eds. (1986). The Lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press. Inc. N.Y. 600 p.

LIN, S.S., LEVITAN, I.B. (1991). Concanavalin A: as tool to investigate neuronal plasticity. TINS, 14(7): 273-277.

*LIN, S.S., DAGAN, D., LEVITAN, I.B. (1989). Concanavalin A modulates a potassium channel in cultured *Aplysia* neurons. Neuron, 3 (1), 95-102.

LINNEVANN, D., BOCK, E. (1989). Cell adhesion molecules in neural development. Dev. Neurosci., 11, 149-173

*LIS, H., SHARON, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem., 55, 35-67.

*LLANO, D.A., RAMIREZ, V.D. (1994). Isolation of DARp (dopamine Releasing Protein) from fetal rat brain and effects of DARp immunoneutralization on fetal mesencephalic dopamine levels. Mol. Cell. Neurosci., 5: 649-657.

*LOCCI, P., EVANGELISTI, R., LILLI, C., BECCHETTI, E., CARINCI, P. (1990). Concanavalin A affects glycosaminoglycans cellular and extracellular accumulation in cultured embryonic fibroblasts. Cell Biol. Int. Rep., 14(7), 641-648.

*LOCKIERBIE, R.O. (1987). The neuronal growth cone: A review of its locomotory, navigational and target recognition capabilities. Neuroscience, 20(3), 719-729.

- M -

MAHAN, J.T., DONALDSON, D.J. (1986). Lectin binding to newt epidermis: fluorescent localization and effects on motility. J. Exp. Zool., 239, 221-228.

*MARCHASE, R.B., KORO, L.A., KELLY, C.M., McCLAY, D.R. (1982). Ligandin from embryonic chick neural retina inhibits cell adhesion. Cell, 28, 813-820.

*MARSH, L., LETOURNEAU, P.C. (1984). Growth of neurites without filipodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. J. Cell Biol., 99, 2041-2047.

*MASSA, S.M., COOPER, D.N.W., LEFFLER, H., BARONDES, S.H. (1993). L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. Biochemistry, 32, 260-267.

*MATSUI, Y., LOMBARD, D., MASSARELLI, R., MANDEL, P., DREYFUS, H. (1986). Surface glycosyltransferase activities during development of neuronal cell cultures. J. Neurochem., 46 (19) 144-150.

*MATSUMOTO, T., OSHIMA, K., MIYAMOTO, A., SAKURAI, M., GOTO, M. HAYASHI, S. (1990). Image analysis of CNS neurotrophic factor effects on neuronal survival and neurite outgrowth. J. Neurosc. Meth., 31, 153-162.

MELLER, K. (1981). Effects of Concanavalin A on developing ganglion cells in the retina chick embryos. J. Embry. Exp. Morph., 65, 27-39.

MERKLE, R.K., CUMMINGS, R.D. (1987). Lectin affinity chromatography of glycopeptides. Meth. in Enzym., 138, 232-259.

*MILOS, N., ZALIK, S.E. (1981). Effects of the ?-D-Galactoside-binding lectin on cell to substratum and cell adhesion of cells from the extraembryonic endoderm to the early chick blastoderm. Wilm Roux's Arch., 100, 259-266.

*MILOS, N.C., WILSON, H.C. (1986). Cell surface carbohydrate involvement in controlling the adhesion and morphology of neural crest cells and melanophores of *Xonopus laevis*. J. Exp. Zool., 238, 211-224.

*MIYAKE, T., FUKUYAMA, R-I., FUJITA, S. (1985). Differentiation of matrix cells and its histochemical aspects in early neurogenesis. Acta Histochem. Cytochem., 18 (19), 77-83.

*MONSIGNY, M., ROCHE, A.C., KIEDA, C. (1978). Lectins as tool to study cell surface membranes. Centre de Biophysique Moléculaire. Ed. Comm. Eur. Comm. Bruxelles, 161-124.

*MOUTSITA, R., BOTTI, J., DOYENNETTE-MOYNE, M.A., AUBERY, M., CODOGNO, P. (1990). Cell spreading on laminin substrates involves Con A binding proteins. Reprod. Nut. Dev., 30, 397-401.

*MULLER, W.E.G., MULLER, I., ZHAN, R.K., KURELEC, B. (1976). Species specific aggregation factor in sponges IV. Aggregation receptor from the cell surface. J. Cell Sci., 21, 227-241.

*MURAMATSU, T. (1988a). Alterations of cell-surface carbohydrates during differentiation and development. Biochimie, 70, 1587-1596.

*MURAMATSU, T. (1988b). Developmentally regulated expression of cell surface carbohydrates during mouse embryogenesis. J. Cell Biochem., 36, 1.14.

*MURAMATSU, T. (1989). Les sucres de la membrane cellulaire. La Recherche, 20 (210), 624-634.

- N -

*NEUGIEBAUER, K.M., TOMASELLI, K.J., LILIEN, J., REICHARDT, L.F. (1988). N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal outgrowth on astrocytes *in vitro*. J. Cell Biol., 107, 1177-1187.

*NEWGREEN, D.F., GIBBINS, I.L., SAUTER, J., WALLENFELS, B., WUTZ, R. (1982). Ultrastructural and tissue culture studies on the role of fibronectin, collagen and glycosaminoglycans in the migration of neural crest cells in the *fowl* embryo. Cell. Tissue Res., 221, 521-549.

NICCOLSON, G.L. (1978). Advanced techniques in biological electron microscopy. Koehler, J.K. ed. Springer Verlag, Berlin. Vol. 2, 1-28.

NICCOLSON, G.L., SINGER, S.J. (1974). The distribution and asymmetry of mammalian cell surface saccharides utilizing ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains. J. Cell Biol., 60 (1), 236-248.

- O -

OAKLEY, R.A., TOSNEY, K.W. (1991). Peanut agglutinin and chondroitin-6-sulfate are molecular markers for tissues that act as barriers to axon advance in the avian embryo. Devel. Biol., 147: 187-206.

ODA, Y., KASAI, K-I. (1984). Photochemical cross-linking of B-galactoside binding lectin to polyactosamino-proteoglycan of chick embryonic skin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 123 (3), 1215-1220.

*OPDENAKKER, G., EUDD, P.M., PONTING, Ch.P., DWEK, R.A. (1993). Concepts and principles of glycobiology. FASEB J., 7: 1330-1337.

*OPPENHEIMER-MARKS, N., GRINNELL, F. (1981). Effects of plant lectins on the adhesive properties of baby hamster kidney cells. Eur. J. Cell Biol., 23, 286-294.

*OUTENREATH, R.L., JONES, A.L. (1992). Influence of an endogenous lectin substrate on cultured dorsal root ganglion cells. J. Neurocytol., 21, 788-795.

- P -

*PAGLIARO, L., WOLFE, J. (1987). Concanavalin A binding induces association of possible mating-type receptors with the cytoskeleton in *Tetrahymena*. Exp. Cell Res., 168, 138-152.

*PAINTER, R.G., GINSBERG, M. (1982). Concanavalin A induces interactions between surface glycoproteins and the platelet cytoskeleton. J. Cell Biol., 92, 565-573.

*PATEL, V.P., LODISH, H.F. (1986). The fibronectin receptor on mammalian erythroid precursor cells: characterization and developmental regulation. J. Cell Biol., 102, 449-456.

*PATTERSON, P.H. (1988). On the importance of being inhibited, or saying no to growth cones. Neuron, 1, 263-267.

*PATTON, W.F., DHANAK, M.R., JACOBSON, B.S. (1989). Differential partitioning of plasma membrane proteins into the Triton X-100-insoluble cytoskeleton fraction during Concanavalin A-induced receptor redistribution. J. Cell Sci., 92, 85-91.

*PEACOCK, J.S., COLSKY, A.S., PINTO, V.B. (1990). Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. J. Immun. Meth., 126, 147-157.

PEPPERL, B., BOHN, B., SAVER, A., BROSSMER, R. (1993). Oligosaccharides on living human neuroblastoma cells of dissimilar degrees of differentiation. Cell Biophys., 23, 165-186.

*PERRIS, R. (1997). The extracellular matrix in neural crest-cell migration. TINS, 20(1): 23- 31.

*PFENNINGER, K.H. (1988). Regulatory mechanisms in nerve growth cones. Curr. Iss. in Neural Reg. Res., 199-207.

*PFENNINGER, K.H., MAYLIE-PFENNINGER, H.F. (1979). Surface glycoconjugates in the differentiating neuron. Complex Carbohydrates of Nervous Tissue (Edited R.U. Margalis and R.K. Margalis) Plenum Publish. Corp., 185-191.

*PFENNINGER, K.H., MAYLIE-PFENNINGER, H.F. (1981a). Lectin labeling of sprouting neurons. I. Regional distribution of surface glycoconjugates. J. Cell Biol., 89, 536-546.

*PFENNINGER, K.H., MAYLIE-PFENNINGER, H.F. (1981b). Lectin labeling of sprouting neurons. II. Relative movement and appearance of glycoconjugates during plasmalemmal expansion. J. Cell Biol., 89, 547-559.

*PFENNINGER, K.H., MAYLIE-PFENNINGER, H.F., FRIEDMAN, L.B., SIMKOWITZ, P. (1984). Lectin labeling of sprouting neurons. III. Type-specific glycoconjugates on growth cones of different origin. Dev. Biol., 106, 97-108.

*PINTO DA SILVA, P., MOSS, PS, FUDENBERG, H.H. (1973). Freeze fracture cytochemistry: replicas of critical point dried cells and tissues after fracture label. Exp. Cell Res., 81, 127-138.

*PLENDERLEITH, M.B., SNOW, P.J. (1993). The plant lectin *Bandeiraea simplicifolia* I-B4 identifies a subpopulation of small diameter primary sensory neurons which innervate the skin in the rat. Neurosc. Lett., 159, 17-20.

POLLERBERG, G.E., BURRIDGE, K., KREBS, K.E., GOODMAN, S.R., SCHACHNER, M. (1987). The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. Cell Tissue Res., 250, 227-236.

*POWELL, J.T. WHITNEY, P.L. (1980). Postnatal development of rat lung. Changes in lung lectin, elastin, acetylcholinesterase and other enzymes. J. Biochem., 188 (1), 1-8.

PROBSTMEIER, R., MONTAG, D., SCHACHNER, M. (1995). Galectin-3, a B-galactoside-binding animal lectin, binds to neural recognition molecules. J. Neurochem., 64: 2465-2472.

PUCHE, A.C., POIRIER, F., HAIR, M., BARTLETT, P.F., KEY, B. (1996). Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. Dev. Biol., 179: 274-287.

*PYTELA, R., PIERSCHBACHER, M.D., RUOSLAHTI, E. (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein expected of a fibronectin receptor. Cell, 40, 191-198.

- R -

RATHJEN, S., WOLFF, J.M., FRANK, R., BONHOEFFER, F., RUTISHAUSER, O. (1987). Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. J. Cell Biol., 104, 343-353.

*RAO, K.M.K., VARANI, J. (1982). Actin polymerization induced by chemotactic peptide and Concanavalin A in rat neutrophils. J. Immunol., 129, 1605-1607.

*RAUVALA, H. (1984). Neurite outgrowth of neuroblastoma cells-dependence on adhesion surface-cell surface interactions. J. Cell Biol., 98, 1010-1016.

*RAUVALA, H., CARTER, W.G., HAKOMORI, S-I, (1981a). Studies on cell adhesion and recognition I. Extent and specificity of cell adhesion triggered by carbohydrate-reactive proteins (glycosidases and lectins) and by fibronectin. J. Cell Biol., 88, 127-137.

*RAUVALA, H., HAKOMORI, S-I. (1981b). Studies on cell adhesion and recognition III. The occurrence of -mannosidase at the fibroblast. Cell surface, and its possible role in cell recognition. J. Cell Biol., 88, 149-159.

*RAUVALA, H., PRIEELS, J.P., FINNE, J. (1983). Cell adhesion mediated by a purified fucosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3991-3995.

*REGAN, L.J., DODD, J., BARONDES, S.H., JESELL, T.M. (1986). Selective expression of endogenous lactose-binding lectins and lactoseries glycoconjugates in subsets of rat sensory neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2248-2252.

*RINI, J.M. (1995). Lectin structure. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 24, 551-577.

*RIOPELLE, R.J., DOW, K.E. (1991). Neurite formation on laminin: effects of a galactosyltransferase on primary sensory neurons. Brain Res., 541, 265-272.

*ROGERS, S.L., LETOURNEAU, P.C., PALM, S.L., MCCARTHY, J., FURCHT, L.T. (1983). Neurite extension of peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. Dev. Biol., 98, 212-270.

*ROSEMAN, S. (1970). The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. Chem. Phys. Lipids, 5, 270-297.

*ROSEN, S., KAFKA, J.A., SIMPSON, D.L., BARONDES, S.H. (1973). Developmentally regulated, carbohydrate-binding protein in Dictyostelium discoideum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2554-2557.

*ROSS, W.N., ARECHIGA, H., NICHOLLS, J.G. (1988). Influence of substrate on the distribution of calcium channels in identified leech neurons in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 (11), 4075-4078.

*ROTSCHENKER, S. (1988). Multiple modes and sites for the induction of axonal growth. TINS, 11 (8), 122, 363-366.

*ROUSSELET, A., AUTILLO-TOUATI, A., ARAUD, D., PROCHIANTZ, A. (1990). *In vitro* regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors. Dev. Biol., 137, 33-45.

*RUNYAN, R.B., MAXWELL, G.D., SHUR, B.D. (1986). Evidence for a novel enzymatic mechanism of neural crest cell migration on extracellular glycoconjugate matrices. J. Cell Biol., 102, 432-441.

*RUTHERFORD, N.G., COOK, G.M.W. (1981). Isolation and characterization of a mannan-binding protein associated with the early chick embryo. FEBS Lett., 136, 105-110.

*RUTISHAUSER, I. (1985). Influence of the neural cell adhesion molecule on axon growth and guidance. J. Neurosci. Res., 13, 123-131.

*RUTKA, J.T., APODACA, G., STERN, R., ROSENBLUM, M. (1988). The extracellular matrix of the central and peripheral nervous system: Structure and function. J. Neurosci., 69, 155-170.

- S -

*SARGENT, P.B. (1989). What distinguishes axon from dendrites? Neurons know more than we do. TINS, 12 (6), 132, 203-205.

*SAXOD, R., BIZET, M.C. (1988). Substrate effects on the dynamics of neurite growth *in vitro* a quantitative multi-parametric analysis. Int. J. Dev. Neurosci., 6 (2), 177-191.

*SCHACHNER, M., MARTINI, R. (1995). Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. TINS, 18(4): 183-191.

SCHETZ, J.A., ANDERSON, P.A.V. (1995). Glycosylation patterns of membrane proteins of the jellyfish *Cyanea capillata*. Cell Tissue Res., 279, 315-321.

*SCHLOSSHAUER, B. (1985). Membrane proteins and glycoproteins specific to central nervous system axons and growth cones. Dev. Brain Res., 19, 237-244.

*SCHWARTZ, D. (1980). Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion, ed.

SCOTT, S.A., PATEL, N., LEVINE, J.M. (1990). Lectin binding identifies a subpopulation of neurons in chick dorsal root ganglia. J. Neurosci., 10 (1), 336-345.

*SHARON, N. (1993). Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. TIBS, 18: 221-226.

*SHARON, N., LIS, H. (1982). In the proteins. H. Neurath and R.L. Hill, ed. Academic, New York, 1-144.

*SHARON, N., LIS, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. Science, 246, 227-246.

*SHIGA, T., OPPENHEIM, R.W. (1991). J. Comp. Neurosc.

*SHURF, B.D. (1982). Cell surface glycosyltransferase activities during fertilization and early embryogenesis, in: The Glycoconjugates, Vol III (M. Horowitz, ed.) Academic Press, New York, 145-185.

*SIEBER-BLUM, M., COHEN, A.M. (1978). Lectin binding to neural crest cells. Changes of the cell surface during differentiation *in vitro*. J. Cell Biol., 76, 628-638.

*SIMPSON, D., THORNE, D., LOH, H. (1977). Developmentally regulated lectin in the neonatal rat brain. Nature (London), 266, 367-369.

*SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of the cell membrane. Science, 175 (23), 720-731.

*SJOLANDER, A., MAGNUSSON, K.E. (1988). Effects of wheat germ agglutinin on the cellular content of filamentous actin in intestine 407 cells. Eur. J. Cell Biol., 47, 32-35.

*SONG, Z., VARANI, J., GOLDSTEIN, I.J. (1993). Differences in cell surface carbohydrates, and in laminin and fibronectin synthesis, between adherent and non-adherent Ehrlich ascites tumor cells. Int. J. Cancer, 55, 1029-1035.

SPELLMAN, D., BURGER, M.M. (1996). Carbohydrate-carbohydrate interactions in adhesion. J. Cell. Biochemistry, 61: 562-568.

*STANLEY, P., IOFFE, E. (1995). FASEB J. 9: 1436-1444.

STEWART, R., ALLAN, D.W., McCAIG, C.D. (1996). Lectins implicate specific carbohydrate domains in electric field stimulated nerve growth and guidance. J. Neurobiol., 30(3): 425-237.

STOLBERG, J., FRASER, S.E. (1988). Acetylcholine receptors and Concanavalin A-binding sites on cultures *Xenopus* muscle cells: electrophoresis, diffusion, and aggregation. J. Cell Biol., 106, 1723-1734.

- T -

*TENOT, M., KUCHLER, S., ZANETTA, J.P., VICENDON, G., HONEGGER, P. (1989). Epidermal growth factor enhances the expression of an endogenous lectin in aggregating fetal brain cell cultures. J. Neurochem., 53 (5), 1435-1441.

*THIERY, J.P., DELOUVEE, A., GALLIN, W.J., CUNNINGHAM, B.A., EDELMAN, G.M. (1984). Ontogenetic expression of cell adhesion molecule : L-CAM is found in epithelial derived from three primary germ layers. Dev. Biol., 102 (1), 61-78.

TIEMEYER, M., GOODMAN, C.S. (1996). Glilectin is a novel carbohydrate-binding protein expressed by a subset of glia in the embryonic *Drosophila* nervous system. Development, 122: 925-935.

TODA, N., DOI, A., JIMBO, A., MATSUMOPO, I., SENO, N. (1981). Interaction of sulfated glycosaminoglycans with lectins. J. Biol. Chem. 256, 5345-5349.

TOH, B.H., HARD, G.C. (1977). Actin co-caps with Concanavalin A receptors. Nature, 269, 695-697.

*TOLKOVSKY, A. (1997). Neurotrophic factors in action -new dogs and new tricks. TINS, 20(1): 1-3.

*TRINKAUS-RANDALL, V., NEWTON, A.W., GIPSON, I.K., FRANZBLAU, C. (1988). Carbohydrate moieties of the basal lamina : their role in attachment and spreading of basal corneal epithelial cells. Cell Tissue Res., 251, 315-323.

*TSUI, C.C., COPELAND, N.G., GILBERT, D.J., JENKINS, N.A., BARNES, C. (1996). Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. J. Neurosci., 16(8): 2463-2478.

*TUAN, T.L., GRINNELL, F. (1988). Wheat-germ-agglutinin and Ricinus communis-agglutinin-binding sites of BHK cells compared with each other and with 140 kDA fibronectin receptors. J. Biochem., 251, 269-277.

*TURNER, D.C., FLIER, L.A., CARBONETTO, S. (1987). Magnesium-dependent attachment and neurite outgrowth by PC-12 cells on collagen and laminin substrata. Dev. Biol., 121, 510-525.

*TURNER, C.E., BURRIDGE, K. (1991). Transmembrane molecular assemblies in cell-extracellular matrix interactions. Curr. Opin. Cell Biol., 3: 849-853.

*TURNER, C.E., SHOTTON, D.M. (1987). Isolation and initial biochemical characterization of caps of two major rat thymocyte glycoproteins: evidence for the involvement of a 205 K Con A binding protein and cytoskeletal components in capping. Cell Motility & Cytoskeleton, 8, 37-43.

- V -

*van den BRÛLE, F., BUICU, C., BALDET, M., SOBEL, M.E., COOPER, D.N.W., MARSCHAL, P., CASTRIGNOVO, V. (1995). Galectin-1 modulates human melanoma cell adhesion to laminin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 209(2), 760-767.

*VANHEMS, E., DELBOS, M. (1989). Ultrastructural localization of lectin-binding sites and laminin-like immunoreactivity in glial cells and neurites growing out from explant cultures of the central nervous system of embryonic *locusts*. Cell Tissue Res., 258, 429-436.

*VASTA, G.R., MARCHOLONIS, J.J. (1983). Humoral recognition factors in the Arthropoda. The specificity of Chelicerata serum lectins? Ann. Zool., 23, 157-171.

*VASTA, G.R., AHMED, H., FINK, N.E., ELOLA, M.T., MARSH, A.G., SNOWDEN, A., ODOM, E.W. (1994). Animal lectins as self/non-self recognition molecules. Ann. N.Y. Acad. Sci., 712, 55-73.

VENIMIGLIA, R., JONES, B.E., MOLLER, A. (1995). A quantitative method for morphometric analysis in neuronal cell culture: unbiased estimation of neuron area and number of branch points. J. Neurosc. Meth., 57, 63-66.

*VERDUGO-DÍAZ, L. MORGADO-VALLE, C., SOLÍS-MALDONADO, G., DRUCKER-COLIN, R. (1997). Determination of Dopamine-releasing protein (DARP) in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders. Arch. Med. Res., 28 (4), 577-581.

*VERNA, J.M. (1985). In vitro analysis of interactions between sensory neurons and skin: evidence for selective innervation of dermis and epidermis. J. Embryol. Exp. Morphol., 86, 53-70.

*VERNA, J.M., FICHARD, A., SAXOD, R. (1989). Influence of glycosaminoglycans on neurite morphology and outgrowth patterns *in vitro*. Int. J. Devl. Neurosc., 7 (4), 389-399.

- W -

*WAECHTER, Ch.J. (1988). Biosynthesis of glycoproteins. En: "Neurobiology of Glycoconjugates" Margolis, R.U. y Margolis R.K., eds. Plenum Press, New York: 127-149.

WEBSTER J.C., KLINGMAN, J.D. (1980). Synaptic junctional glycoconjugates from chick brain. Glycoprotein identification and carbohydrate composition. Neurochemical Res., 5 (4), 401-412.

*WEIS, W.I., QUESENBERRY, M.S., TAYLOR, M.E., BEZOUKA, K., HENDRICKON, W.A., DRICKAMER, K. (1992). Molecular mechanisms of complex carbohydrate recognition at the cell surface. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. LVII, 281-289.

*WEIS, W.I., DRICKAMER, K., HENDRICKON, W.A. (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. Nature, 360, 127-134.

*WEIS, W.I. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annu. Rev. Biochem., 65, 441-473.

*WELLS, T.N.C., GRABER, P., PROUDFOOT, A.E.I., AROD, C.Y., JORDAN, S.R., LAMBERT, M.H., HASSELL, A.M., MILBURN, M.V. (1994). The three-dimensional structure of human interleukin-5 at 2.4-angstroms resolution: Implication for the structures of other cytokines. Cell. Cytok. Lung Inflamm., 25, 118-127.

WESSELS, N.K. (1982). Axon elongation a special case of cell locomotion. En "Cell Behavior". R. Bellairs, A. Curtis, G. Dunn, eds. 225-246.

WESSELS, N.K., JOHNSTON, S.R., NUTTALL, R.P. (1978). Axon initiation and growth cone regeneration in cultures motor neurons. Exp. Cell. Res., 117, 335-345.

*WHEELER, M.E., GERRARD, J.M., CARROLL, R.C. (1985). Reciprocal transmembranous receptor-cytoskeleton interactions in Concanavalin A-activated platelets. J. Cell Biol., 101, 993-1000.

- Y -

*YAMADA, K., AKEDA, K. (1982). Purification and partial characterization of hemagglutinins in seminal plasma of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. Biochim. Biophys. Acta, 709, 220-226.

*YOSHIZAKI, M. (1990). Functions and properties of animal lectins. Zool. Sci., 7, 581-591.

- Z -

*ZALIK, S.E., MILOS, N., LEDSHAM, I. (1983). Distribution of two ?-D-galactoside binding lectins in the gastrulating chick embryo. Cell Diff., 12, 121-127.

*ZALIK, S.E., MILOS, N. (1986). Endogenous lectins and cell adhesion in embryonic cells. Dev. Biol., Vol. 2 Leon W. Browder ed. Plenum Publ. Corp., 145-194.

*ZALIK, S.E., THOMSON, L.W., N., LEDSHAM, I.M. (1987). Expression of an endogenous galactose-binding lectin in the early chick embryo. J. Cell Sci., 88, 483-493.

*ZANETTA, J.P., MEYER, A., KUCHLER, S., VINCENDON, G. (1987). Isolation and immunochemical study of a soluble cerebellar lectin delineating its structure and function. J. Neurochem., 49, 1250-1257.

*ZANETTA, J.P., KUCHLER, S., LEHMANN, S., BADACHE, A., MASCHKE, S., THOMAS, D., DUFOURCQ, P., VINCENDON, G. (1992). Glycoproteins and lectins in cell adhesion and cell recognition processes. Histochem. J., 24, 791-804.

*ZANETTA, J.P., SCIOR, T., WANTYGHEM, J., WERMUTH, C., AUBERY, M., STRECKER, G., MICHALSKI, J.C. (1996). Lectin activities of cytokines and growth factors: function and implications for pathology. Histol. Histopathol., 11: 1101-1108.

ZHOU, Q., CUMMINGS, R.D. (1993). L-14 lectin recognition of laminin and its promotion on *in vitro* and adhesion. Arch. Biochem. Biophys., 300: 6-17.