

# DETECCION Y CARACTERIZACION PRELIMINAR DE LECTINAS PRESENTES EN SEMILLAS DE LEGUMINOSAS

\* NAVARRO YOLANDA DE.

\*\* PÉREZ GERARDO.

Bogotá, D. E., Colombia.

## SUMARIO

La aglutinación de eritrocitos humanos o animales fue ensayada con 23 especies de leguminosas. Las semillas de *Bauhinia picta*, *Tamarindus indica*, *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia* poseen lectinas inespecíficas para el sistema ABO; *Crotalaria agatifolia*, *C. spp*, *Cassia indecora* y *Ormosia spp*, presentan cierto grado de especificidad. Se ensayaron eritrocitos de seis especies animales, observándose aglutinación con las especies ya citadas y además con *Cassia fruticosa*, *C. reticulata*, *Delonix regia*, *Poinciana pulquerrima*, *Abrus fruticulosus* y *Mucuna mutisiana*. Los ensayos de inhibición con carbohidratos indican que las lectinas de *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia* actúan sobre receptores diferentes.

## ABSTRACT

The agglutination of human and animal erythrocytes by 23 species of leguminosae was assayed. The species *Bauhinia picta*, *Tamarindus indica*, *Dioclea lehmannii* and *Erythrina rubrinervia*

---

\* Instructor Asociado, D. O. Depto. Química, U. N.

\*\* Profesor Asociado, D. E. Depto. Química, U. N.

have lectins which showed no specificity for the ABO system; *Crotalaria agatifolia*, *C. spp*, *Cassia indecora* and *Ormosia spp* have some degree of specificity. Erythrocytes from six animal species were agglutinated by the above species and also by *Cassia fruticosa*, *C. reticulata*, *Delonix regia*, *Poinciana pulquerrima*, *Abrus fruticulosus* and *Mucuna mutisiana*. Inhibition assays with carbohydrates showed that the lectins of *Dioclea lehmannii* and *Erythrina rubrinervia* interact with different receptors.

## INTRODUCCION

Las leguminosas que podríamos llamar no tradicionales, debido a su escaso o nulo consumo, ocupan un lugar preponderante por su abundancia y sin embargo han sido muy poco estudiadas como fuentes potenciales de proteína. Uno de los aspectos que deben considerarse cuando se evalúa el valor nutricional de semillas de leguminosas, es la posible existencia de factores antinutricionales tales como fitohemoaglutininas (lectinas), inhibidores enzimáticos, alcaloides, aminoácidos tóxicos, etc. (Liener) (1). La detección y caracterización de lectinas presenta un interés múltiple, pues además de contribuir o no a la toxicidad de una determinada especie de leguminosa (1, 2, 3), estas proteínas poseen una serie de propiedades biológicas (interacciones específicas con receptores en membranas de eritrocitos y de otras células, mitogenicidad, aglutinación diferencial de células normales y transformadas, inmunosupresores en ciertos casos, etc.), (4, 5, 6), que las han convertido en una herramienta utilísima en multitud de estudios bioquímicos, biológicos y clínicos.

Estos hechos, aunados a la circunstancia de poseer una flora excepcionalmente rica en leguminosas (700 especies clasificadas en el Herbario Nacional Colombiano), nos impulsaron a comenzar una investigación sistemática con el objeto de detectar y caracterizar, así sea preliminarmente, las lectinas de aquellas leguminosas no tradicionales que podrían convertirse en una nueva fuente de proteínas o en materia prima para la obtención de lectinas específicas.

## MATERIALES Y METODOS

### *Procedencia y tratamiento de las especies estudiadas.*

La tabla I resume las especies analizadas, su procedencia y las condiciones de extracción empleadas en cada caso. Según el estado

de maduración de las semillas se emplea uno u otro de los siguientes procedimientos:

En el caso de semillas inmaduras (verdes), se suspende la muestra en NaCl 1% (1:5, p/v) o (1:10, p/v) (muestra: solvente) y se homogeniza en una licuadora Osterizer durante 3 minutos a máxima velocidad; luego se extrae, con agitación ocasional, durante 2 horas a temperatura ambiente. Se centrifuga a 3.500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se almacena en congelador (-15°C).

En el caso de semillas maduras (secas), la muestra se muele y la harina (aproximadamente 60 mallas) se extrae con NaCl 1% (relación muestra: solvente, 1:5 o 1:10 p/v) durante 2 horas a temperatura ambiente agitando mecánicamente. Se centrifuga a 3.500 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se guarda en congelador.

#### T A B L A I

*Procedencia y tratamiento de las especies.*

	Nombre vulgar	Procedencia	Preparación extracto - Relación Muestra: NaCl 1% p/v
<i>Mimosácea.</i>			
Acacia spp . . . . .	Acacia	Bogotá (Cund.)	1:5
Neltuma juliflora . . .	Trupillo	Ciénaga (Magd.)	1:10
Inga edulis . . . . .		Apiay (Meta)	1:10
<i>Cesalpínácea.</i>			
Bauhinia picta (Syn. Kalbreyeri) . . . . .	Pata de Vaca	Bucaramanga (Santander Sur)	1:5
Cassia fruticosa . . . .		Apiay (Meta)	1:5
Cassia reticulata . . . .		Apiay (Meta)	1:5
Cassia tomentosa . . . .	Alcaparro	Bogotá (Cund.)	1:5
Cassia indecora . . . . .		Guateque (Boyacá)	1:5
Delonix regia (Comp.)	Acacia	Ciénaga (Magd.)	1:5
Delonix regia (germen)			1:10
Delonix regia (Endos.)			1:10

	Nombre vulgar	Procedencia	Preparación extracto - Relación Muestra: NaCl 1% p/v
<i>Lupinus mirabilis</i> . . . .	Chochos	Represa El Neusa (Cund.)	1:5
<i>Poinciana pulquerrima</i>		Apiay (Meta)	1:5
<i>Sciacassia siamea</i> . . . .	Acacia	Pto. La Cruz (Venez.)	1:5
<i>Tamarindus indica</i> ..	Tamarindo	Ciénaga (Magd.)	1:5
<i>Papilionácea.</i>			
<i>Abrus fruticulosus</i> . . .	Chochos	Vaupés	1:5
<i>Crotalaria agatifolia</i> ..	Pajarito	Bogotá (Cund.)	1:5
<i>Crotalaria mucronata</i> .		Apiay (Meta)	1:5
<i>Crotalaria spp</i> . . . . .		Machetá (Cund.)	1:5
<i>Dalea cerulea</i> . . . . .	Chiripique	Machetá (Cund.)	1:10
<i>Dioclea lehmannii</i> . . .		Machetá (Cund.)	1:5
<i>Erythrina rubrinervia</i>	Chocho de árbol	Guateque (Boyacá)	1:5
<i>Mucuna mutisiana</i> . . .	Ojo de Buey Ojo de Venado	Ciénaga (Magd.)	1:5
<i>Ormosia spp</i> . . . . .		Hacienda Palestina (Caldas)	1:10
<i>Ormosia towarensis</i> ..		Río Arma (Ant.)	1:10

### *Ensayos de aglutinación.*

La sangre de la especie respectiva (colectada en presencia de anticoagulante) se centrifuga a 3.000 rpm durante 10-15 minutos. Se eliminan el sobrenadante y los leucocitos aspirando cuidadosamente la capa superior, los eritrocitos se suspenden en aproximadamente 10 volúmenes de NaCl 1% y se centrifugan en las condiciones descritas. Se elimina el sobrenadante y el lavado se repite por dos veces más; finalmente el volumen de eritrocitos sedimentados se suspende en NaCl 1% hasta obtener una dilución del 4% (v/v).

Para determinar la capacidad de aglutinación se utilizaron los siguientes métodos:

a) *Evaluación cualitativa en tubo de ensayo.*

A 0.2 ml de la suspensión de eritrocitos se agregan 0.2-0.5 ml del extracto salino de las semillas, se mezcla bien y se deja en reposo a temperatura ambiente. Se observa la aglutinación a diferentes tiempos utilizándose los siguientes índices:

(—): aglutinación inexistente. (1): aglutinación débil, formación de aglomerados apenas perceptibles. (2): aglutinación mediana, aglomerados pequeños. (3): aglutinación fuerte, aglomerados considerables. (4): aglutinación completa.

b) *Evaluación cualitativa en placa.*

En una placa portaobjetos se colocan 25  $\mu$  l de NaCl 1%, 5  $\mu$  l del extracto salino de las semillas y 10  $\mu$  l de la suspensión de eritrocitos. Se mezcla bien con una pequeña varilla de vidrio y se observa el grado de aglutinación a los 5 minutos y a los 30 minutos, utilizándose los índices arriba mencionados.

c) *Evaluación cuantitativa por migración capilar.*

Se empleó el método normalizado por De Navarro y Pérez (7).

Las concentraciones de proteína de los extractos utilizados en estos ensayos, se determinaron por micro-Kjeldhal (8).

*Ensayos de inhibición de aglutinación.*

Los diferentes carbohidratos o polialcoholes ensayados se disuelven en una solución de NaCl 1% NaN<sub>3</sub> 1%, obteniéndose las concentraciones indicadas en la tabla II.

T A B L A I I

*Soluciones de carbohidratos y polialcoholes.*

	Abreviatura	mg/ml
D(—) Arabinosa . . . . .	Arab	11.6
D(+) Xilosa . . . . .	Xil	11.6
D(—) Fructuosa . . . . .	Fre	15.4
D(+) Galactosa . . . . .	Gal	15.4
D(—) Galactosamina . . . . .	GalNH <sub>2</sub>	11.3
N— Acetil $\alpha$ D. Galactosamina . . . . .	NAcGalNH <sub>2</sub>	11.3
D(—) A. Galacturónico . . . . .	GalU	11.5
D(+) Glucosa . . . . .	Glc	11.2
D(—) Glucosamina . . . . .	GlcNH <sub>2</sub>	11.2

	Abreviatura	mg/ml
N - Ac <sub>a</sub> D. Glucosamina . . . . .	NAcGlcNH <sub>2</sub>	11.3
D(-) Manosa . . . . .	Man	11.1
D(-) Manitol . . . . .	Manl	10.4
L(-) Sorbosa . . . . .	Sorb	11.2
D(-) Sorbitol . . . . .	Sorbl	11.7
D(-) Fucosa . . . . .	Fuc	11.3
D(+) Celobiosa . . . . .	Cel	11.4
D(+) Melibiosa . . . . .	Melb	15.4
D(+) Lactosa . . . . .	Lac	11.2
D(+) Sacarosa . . . . .	Sac	15.4
D(+) Melezitosa . . . . .	Melz	15.4
D(+) Rafinosa . . . . .	Raf	11.6

Los ensayos de inhibición se realizan por el método de placa tomando 25  $\mu$  l de la solución de carbohidratos a los que se añaden 5  $\mu$  l de la solución proteína (extracto salino) que haya mostrado buena capacidad (índice 2 o superior) hemoaglutinante. Se incuba la mezcla durante media hora y se agregan 10  $\mu$  l de la suspensión respectiva de eritrocitos. Se lee el grado de aglutinación a los 5 minutos y a los 40 minutos.

#### *Ensayos con eritrocitos tripsinizados.*

Para la tripsinización se emplea especialmente la técnica descrita por Pérez (9). Se prepara una solución de tripsina (Merck) (10 mg/ml) en un buffer de fosfatos 0.2 M pH 7.2 CaCl<sub>2</sub> 0.01 M. A un volumen de esta solución se agregan cuatro volúmenes de la suspensión de eritrocitos (4%) incubándose la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifuga a 4.000 rpm y 4°C durante 15 minutos; se elimina el sobrenadante y el residuo se suspende en un volumen igual al inicial, de una solución de NaCl 1% enfriada a 4°C. Se centrifuga según las condiciones anotadas y el residuo es lavado por dos veces más en igual forma. Finalmente los eritrocitos tripsinados se suspenden en NaCl 1% hasta obtener una concentración aproximada de 4%.

Los ensayos de aglutinación se efectúan en tubo de ensayo o por migración capilar utilizando las condiciones ya descritas.

*Aglutinación de eritrocitos humanos.*

Los resultados de los ensayos realizados con eritrocitos pertenecientes a los grupos A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup> y O<sup>+</sup>, se indican en las tablas III y IV.

T A B L A I I I

*Ensayos cualitativos de aglutinación de eritrocitos humanos.*

	Tipo A+		Tipo B+		Tipo O+	
	4h	24h	4h	24h	4h	24h
<i>Mimosácea.</i>						
<i>Inga edulis</i> . . . . .		— <sup>(1)</sup>		— <sup>(1)</sup>		— <sup>(1)</sup>
<i>Cesalpiniácea.</i>						
<i>Bauhinia picta</i> (syn-Kalbreyeri) . . . . .	3		3		3	3
<i>Cassia fruticosa</i> (V) . . . . .	—	—	—	—	—	—
<i>Cassia fruticosa</i> (M) . . . . .		—		—		—
<i>Cassia reticulata</i> (V) . . . . .	—	—	—	—	—	—
<i>Cassia reticulata</i> (M) . . . . .		—		—		—
<i>Cassia tomentosa</i> . . . . .					— <sup>(1)</sup>	
<i>Lupinus mirabilis</i> . . . . .					—	—
<i>Papilionácea.</i>						
<i>Abrus fruticulosus</i> . . . . .	—	— <sup>(1)</sup>	—	— <sup>(1)</sup>	— <sup>(1)</sup>	— <sup>(1)</sup>
<i>Ormosia</i> spp . . . . .	—	—	—	—	—	—
<i>Ormosia tovarensis</i> . . . . .	—	—	—	—	—	—

(1) Se observa hemólisis.

Los espacios en blanco indican observaciones no realizadas.

T A B L A I V

Determinación por migración capilar de la aglutinación de eritrocitos humanos.

LEGUMINOSA	Tipo 15*	A+ 60*	Tipo 15*	B+ 60*	Tipo 15*	O+ 60*	Conc. Prot. mg/ml
<i>Mimosácea.</i>							
Acacia spp . . . . .	3	4	4	6	3	8	N.D.
Neltuma juliflora . . . . .	1	1	3	4	4	6	3.8
<i>Cesalpinácea.</i>							
Bauhinia picta . . . . .	56	59	78	82	75	78	N.D.
Cassia indecora . . . . .	3	18	8	17	15	31	N.D.
Delonix regia (completa)	0	1	3	4	0	4	6.9
D.regia (endospermo) ..	0	0	10	17	1	8	0.7
D.regia (germen) . . . . .	3	4	6	7	7	6	N.D.
D.regia (pigmento) . . . . .	6	6	3	4	4	6	1.3
Poinciana pulquerrima ..	3	1	3	4	6	4	3.8
Sciacassia siamea . . . . .	0	3	4	6	6	3	N.D.
Tamarindus indica (M) ..	12	14	7	8	10	14	0.7
Tamarindus indica (V) ..	88	93	87	91	94	94	6.1

\* Tiempo de observación (minutos).  
N.D.: No determinada.

LEGUMINOSA	Tipo 15*	A+ 60*	Tipo 15*	B+ 60*	Tipo 15*	O+ 60*	Conc. Prot. mg/ml
<i>Papilionácea.</i>							
Abrus fruticulosus . . . . .	4	7	13	12	6	7	N.D.
Crotalaria agatifolia (M)	27	39	4	7	1	10	3.6
Crotalaria agatifolia (V)	10	13	6	7	4	4	2.2
Crotalaria mucronata (M)	1	1	6	7	3	4	7.7
Crotalaria mucronata (V)	2	3	4	6	4	3	8.4
Crotalaria spp (M) . . . . .	27	77	20	21	86	89	30.1
Crotalaria spp (V) . . . . .	2	1	30	36	0	2	8.2

LEGUMINOSA	Tipo 15*	A+ 60*	Tipo 15*	B+ 60*	Tipo 15*	O+ 60*	Conc. Prot. mg/ml
<i>Dalea cerulea</i> . . . . .	0	0	1	3	3	3	4.5
<i>Dioclea lehmannii</i> (M) . .	97	98	97	98	97	99	20.8
<i>Dioclea lehmannii</i> (V) . .	98	98	97	98	97	97	3.8
<i>Erythrina rubrinervia</i> (M)	97	100	86	94	97	98	20.1
<i>Erythrina rubrinervia</i> (V)	14	15	15	18	1	4	4.8
<i>Mucuna mutisiana</i> . . . . .	6	5	6	7	6	6	14.0
<i>Ormosia</i> spp . . . . .	0	13	0	0	19	26	N.D.
<i>Ormosia tovarensis</i> . . . .	2	1	3	0	0	0	N.D.

\* Tiempo de incubación (minutos).  
N.D.: No determinada.

Los ensayos cualitativos (tabla III), indican la presencia de lectinas únicamente en las semillas de *Bauhinia picta*, observándose inespecificidad total respecto al grupo sanguíneo lo cual coloca esta especie en el mismo grupo que las *B. cunninghamii*, *B. racemosa* y *B. tomentosa* estudiadas en la revisión de Toms y Western (10). Es interesante anotar los resultados negativos obtenidos con *Abrus fruticulosus* y con las tres especies de *Cassia* analizadas, ya que con bastante frecuencia estos géneros poseen lectinas (10); específicamente en el caso de *C. reticulata*, los resultados no concuerdan con los obtenidos por Tiggelman Van-Krugten et al. (11).

Los ensayos cuantitativos de aglutinación (tabla IV) demuestran la existencia de lectinas en los extractos salinos de *Bauhinia picta*, *Tamarindus indica* (inmaduro), *Crotalaria agatifolia* (madura) *Crotalaria* spp (madura), *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia*.

Los resultados obtenidos con *Cassia indecora* y *Ormosia* spp señalan una débil actividad hemoaglutinante frente a eritrocitos de grupo O<sup>+</sup>. En el caso de *Tamarindus indica* es interesante notar la marcada diferencia que existe entre las semillas maduras e inmaduras, pero la aparente ausencia de lectinas en la muestra madura podría deberse a la baja concentración de proteína (0.7 mg/ml) en el extracto usado en la determinación; los resultados obtenidos por otros autores son contradictorios ya que Renkonen (12) y Makela (13) no detectaron lectinas en esta especie, mientras

que Tiggelman-Van Krugten et al. (11) y Boyd et al. (14) sí las reportan. Puesto que ninguno de los autores citados especifica el grado de madurez de sus muestras, es imposible tratar de explicar la contradicción.

Entre las Papilionáceas estudiadas, la *Dioclea lehmannii* y la *Erythrina rubrinervia* son las que presentan las mayores actividades hemoaglutinantes, observándose en esta última la inactividad de las semillas inmaduras (verdes); en el caso particular de *Erythrina* las lectinas parecen estar ampliamente distribuidas en este género puesto que en las 10 especies estudiadas previamente por Makela (13), Boyd et al. (14) y de Gómez y Pérez (15), se ha establecido en todas su presencia y bajo grado de especificidad.

Makela (13), analizó la *Dioclea glycinoides* y *D. malacocarpa*, encontrando lectinas únicamente en la primera.

En lo que concierne a la especificidad para aglutinar un grupo sanguíneo dado, es evidente que *Crotalaria agatifolia* presenta un cierto grado de especificidad frente a eritrocitos A<sup>+</sup>, siendo similar en este aspecto a *C. aegyptiaca* y *C. breviflora* (10); se nota una diferencia interesante de especificidad respecto a las muestras de *Crotalaria* spp ya que la muestra inmadura aglutina preferencialmente eritrocitos B<sup>+</sup> y la madura, O<sup>+</sup>, para tiempos cortos de aglutinación.

#### *Agglutinación de eritrocitos animales.*

El examen de la tabla V muestra que de las 16 especies analizadas solo *Cassia fruticosa*, *C. reticulata*, *Poinciana pulquerri- ma*, *Tamarindus indica* y *Dioclea lehmannii*, son capaces de aglutinar, aunque no muy fuertemente, los eritrocitos tripsinizados de bovino. Si se considera el hecho de que sólo *D. lehmannii* aglutina además los eritrocitos de conejo, esto clasificaría esta especie como perteneciente al grupo A propuesto por Jaffé y Brucher (16) y *Cassia fruticosa*, *C. reticulata*, *Poinciana pulquerri- ma* y *Tamarindus indica* como pertenecientes al grupo C. Dado que estos grupos fueron establecidos por Jaffé y Brucher, utilizando extractos de *Phaseolus vulgaris*, sería necesario comprobar in vivo la posibilidad de que estas cinco especies presenten toxicidad por vía oral o parenteral. No hay que olvidar, sin embargo, que de las especies restantes algunas o todas pueden poseer otros principios tóxicos (ej. alcaloides en *E. rubrinervia*) que limiten su eventual utilización para consumo humano o animal.

T A B L A V

Ensayos cualitativos de aglutinación con eritrocitos animales.

	Bovino		Canino		Equino		Bafido <sup>(1)</sup>		Ovino	
	S. Trip 4*	Trips 22*	S. Trip 4*	Trips 22*	S. Trip 4*	Trips 22*	S. Trip 22*	Trips 4*	S. Trip 22*	Trips 24*
<i>Mimosáceas.</i>										
<i>Neluma juliflora</i> . . . . .	—	—	—	?	—	—	—	—	4	3
<i>Centipindées.</i>										
<i>Cassia fruticosa</i> . . . . .	—	1	—	?	—	—	—	—	—	—
<i>Cassia reticulata</i> . . . . .	—	1	—	1	—	1	1**	1	—	2
<i>Delonix regia</i> (pigmento) . . . . .	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
<i>Delonix regia</i> (total) . . . . .	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
<i>Poinciana pulcherrima</i> . . . . .	—	1	—	—	—	—	?	—	—	—
<i>Tamarindus indica</i> (V) . . . . .	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Sciacaussia siamen</i> . . . . .	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	4	1
<i>Peplionidées.</i>										
<i>Abrus fruticulosus</i> . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Crotalaria agatifolia</i> (M) . . . . .	—	—	—	?	—	—	—	1	3	4
<i>Crotalaria agatifolia</i> (V) . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—**
<i>Crotalaria mucronata</i> (M) . . . . .	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—
<i>Crotalaria mucronata</i> (V) . . . . .	—	—	—	—**	—	—	—**	—	—	—
<i>Crotalaria</i> spp (M) . . . . .	—	—	—	1	—	—	—	—	—	?
<i>Crotalaria</i> spp (V) . . . . .	—	1	—	—	—	—	—	—	1	2
<i>Dioclea lehmannii</i> (M) . . . . .	—	—	—	2	3	4	2	2	4	4
<i>Dioclea lehmannii</i> (V) . . . . .	—	—	—	1	2	3	3	2	3	4
<i>Erythrina rubrinervia</i> (M) . . . . .	—	—	—	7	2	—	—	—	3	1
<i>Erythrina rubrinervia</i> (V) . . . . .	—	—	—	—	?	—	—	—	?	—
<i>Mucuna mutisiana</i> . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ormosia</i> spp . . . . .	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	4	4
<i>Ormosia tovarensis</i> . . . . .	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**	—**

(1) Especie *Bufo marinus*.  
 ? Frueba dudosa.  
 \* Tiempo de observación (horas).  
 \*\* Se observa hemólisis.  
 S. Trip: Eritrocitos sin tripsinizar.

Los eritrocitos de canino y equino no tratados con tripsina muestran un comportamiento muy similar ya que sólo *Cassia reticulata* y *Dioclea lehmannii* los aglutinan. La tripsinización de los eritrocitos de canino induce su aglutinabilidad por parte de otras especies de leguminosas, aunque de manera moderada ya que no se obtienen aglutinaciones muy fuertes. En contraste con lo anterior, se observa que la proteólisis limitada de los eritrocitos equinos no ocasiona cambios en su aglutinabilidad.

La aglutinación de eritrocitos de *Bufo marinus* se presenta únicamente con *Crotalaria agatifolia*, *Mucuna mutisiana*, *Cassia reticulata* y *Dioclea lehmannii*, comportándose así las lectinas de estas dos últimas especies en forma muy similar frente a eritrocitos de tan diverso origen; como era de esperarse la tripsinización posibilita que otras especies aglutinen los eritrocitos de *Bufo marinus*.

Los ensayos realizados con eritrocitos de cordero (no tripsinizados) muestran que estos son aglutinados únicamente por *Cassia fruticosa*, *Crotalaria* spp, *Bauhinia picta* y *Abrus fruticulosus*.

Se observó además que *Crotalaria* spp, *Dioclea lehmannii*, *Erythrina rubrinervia* y *Mucuna mutisiana* poseen lectinas capaces de aglutinar los eritrocitos de conejo.

Los resultados de las medidas de aglutinación por migración capilar (tabla VI) de los diversos tipos de eritrocitos, no tripsinizados, confirman la presencia de lectinas, de actividad variable, en las especies *Bauhinia picta*, *Cassia indecora*, *Crotalaria agatifolia* y *C. spp.* La tripsinización de los eritrocitos favorece, como es de esperar, su aglutinación por parte de la mayoría de los extractos proteicos.

TABLE VI

Determinación por migración capilar de la aglutinación con eritrocitos animales.

	Bovino			Canino			Equino			Báfido		
	S. Trip 60*	Trips 15*	60*	S. Trip 60*	Trips 15*	60*	S. Trip 60*	Trips 15*	60*	S. Trip 60*	Trips 15*	60*
<i>Cesalpiniácea.</i>												
<i>Bauhinia picta</i> (syn <i>kalbreyeri</i> ) . . . . .							85	94	94			
<i>Cassia indecora</i> . . . . .	1	10	85	27	85	97	82		94	3	88	88
<i>Delonix regia</i> (completa)										9	87	86
<i>Delonix regia</i> (germen)	0	0	48	0	71	87	0	0	0	9	70	85
<i>Delonix regia</i> (endospermo) . . . . .	0	0	0	0	13	85	3	63	86	21	78	89
<i>Tamarindus indica</i> (M)	0	0	3	3	85	88	1	4	4	4	85	79

	Bovino			Canino			Equino			Búfido		
	S. Trip	Trips		S. Trip	Trips		S. Trip	Trips		S. Trip	Trips	
	60*	15*	60*	60*	15*	60*	60*	15*	60*	60*	15*	60*
<i>Papilionácea.</i>												
<i>Abrus fruticulosus</i> .. . . .	4	3	43	13			13	3	12	29		
<i>Crotalaria agatifolia</i> (M) .. .	18		10	22								
<i>Crotalaria agatifolia</i> (V) .. .	24		19	23								
<i>Crotalaria</i> spp (M) .. . . .				77			95	57		59		
<i>Crotalaria</i> spp (V) .. . . .				0			15	56		75		
<i>Dalea cerulea</i> .. . . . . . . .	0	10	13	13	12	88	1	0	0	9	85	83
<i>Ormosia</i> spp .. . . . . . . . .	0	88	49	13		14	4	0	0			
<i>Ormosia tovarensis</i> .. . . . .	1	7	57	5		4	7	6	3			

\* Tiempo observación (minutos).

El comportamiento análogo de los eritrocitos equinos y caninos no tripsinizados (tablas V y VI) respecto a cada una de las especies estudiadas, indica que los receptores de las lectinas deben ser similares en los eritrocitos de las dos especies animales. Esta hipótesis está apoyada por los resultados obtenidos en el estudio de la aglutinación de eritrocitos animales por parte de una lectina presente en la *Canavalia brasiliensis* (9), en el cual se observó un comportamiento igual al aquí descrito. Un análisis de los resultados obtenidos cuando se ensayan eritrocitos de estas especies (ver revisión de Toms y Western) (10) con extractos de *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba*, *Vicia sativa*, *Pisum sativum* y *Medicago sativa* provee evidencia adicional.

Existen discrepancias notables entre los diferentes grupos de investigadores (11, 13, 14), que han estudiado la aglutinabilidad de eritrocitos animales utilizando algunas de las especies empleadas por nosotros:

— Tiggelman-Van Krugten et al. (11), observan que la *Cassia fruticosa* (syn *bacillaris*) aglutina eritrocitos de ovino mientras que Boyd et al. (14) consideran que esta especie no posee lectinas.

— Tiggelman-Van Krugten et al. (11), han propuesto la presencia de una lectina en *Delonix* capaz de aglutinar inespecíficamente eritrocitos humanos y eritrocitos animales; estos resultados no han podido ser confirmados por nosotros, ni por el grupo de Sotelo (17) ni por Makela (13), con eritrocitos de vaca, ovejo, conejillo de Indias, pollo en humanos normales o papainizados; siendo necesario tripsinizar los eritrocitos de algunas especies animales para observar la aglutinación. Esta condición explica tal vez los resultados negativos obtenidos por un buen número de investigadores (13, 14, 18).

— Se presenta una situación similar con *Tamarindus indica* con la cual Tiggelman-Van Krugten et al. (11), observan aglutinación de eritrocitos de gallina, oveja y conejillo de Indias, mientras que nuestros resultados indican que sólo por tripsinización los eritrocitos de algunas especies son susceptibles de ser aglutinados por los extractos de *Tamarindus indica*.

El conjunto de los resultados obtenidos con los eritrocitos de las diversas especies animales implica que el criterio utilizado comúnmente para determinar si una leguminosa posee o no lectinas, basado en ensayos con eritrocitos humanos, bovinos (tripsinizados) y de conejo, no es adecuado ya que existen leguminosas [*Delonix regia*, *Tamarindus indica* (maduro)] que no lo satisfacen y sin embargo aglutinan eritrocitos de otras especies animales.

#### *Inhibición de aglutinación de eritrocitos humanos.*

Se realizaron ensayos preliminares de inhibición de aglutinación por adición de carbohidratos utilizando las especies que según la tabla IV muestran capacidad hemoaglutinante. Las especies *Tamarindus indica* (inmadura), *Crotalaria agatifolia* y *Crotalaria* spp no presentan aglutinación observable por el método de placa y los extractos de *Bauhinia picta* ocasionan un pardeamiento rápido de los eritrocitos, lo cual hace difícil observar la eventual acción inhibidora de los carbohidratos; por ello estas especies no fueron estudiadas detalladamente.

Los resultados obtenidos con *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia* se presentan en la tabla VII. Con la primera, la N-acetil galactosamina y la sacarosa muestran la mayor capacidad inhibidora mientras que la galactosa, lactosa y melezitosa sólo inhiben parcialmente cuando se usan eritrocitos de los grupos A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>; se observa además que existe una diferencia apreciable frente a eritrocitos B<sup>+</sup> y O<sup>+</sup> respecto a la capacidad inhibidora de la arabinosa, galactosamina, melibiosa y rafinosa. Considerando las estructuras de los mencionados carbohidratos (exceptuando la arabinosa, sacarosa y melezitosa) y las de los respectivos oligosacáridos determinantes de los grupos sanguíneos (19), se deduce que la lectina presente en *D. lehmannii* posee un sitio que interactúa con la galactosa situada internamente en estos oligosacáridos y en la cual sólo sería necesario que los hidroxilos 4' y 6' estén libres; este requerimiento se basa en que todos los carbohidratos considerados tienen esta característica en común, difiriendo ampliamente en otros aspectos estructurales. El poder inhibidor parcial de Arab, Sac y

Melz no puede ser explicado, si bien se observa que su acción es más efectiva con eritrocitos de grupo A<sup>+</sup> o B<sup>+</sup> que con eritrocitos O<sup>+</sup>.

Como alternativa se podría proponer que el receptor de la lectina sea una de las sialoglicoproteínas presentes en la membrana, caso en el cual no debería observarse relación alguna entre la capacidad inhibitoria del carbohidrato y el grupo A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup>, O<sup>+</sup>; el carbohidrato determinante sería la Gal y/o la N-Ac Gal NH<sub>2</sub> que interviene también internamente en la estructura de los antígenos MN (20). Esta hipótesis se confirmaría si se establece que esta sialoglicoproteína aislada interactúa específicamente con la lectina en cuestión; el papel de N-acetil neuramínico podría establecerse determinando la aglutinabilidad antes y después de un tratamiento con neuraminidasa.

T A B L A V I I

Inhibición por carbohidratos de la aglutinación de eritrocitos humanos (1).

	<i>Dioclea lehmannii</i>			<i>Erythrina rubrinervia</i>		
	A+	B+	O+	A+	B+	O+
Arab . . . . .		1	3		4	3
Xil . . . . .		2	4		3	3
Fruc . . . . .		4	2		4	2
Gal . . . . .	—	1	2	—	—	—
GalNH <sub>2</sub> . . . . .	1	—	3	—	—	—
NAcGalNH <sub>2</sub> . . . . .	—	—	1	—	—	—
GalU . . . . .		2	3		4	3
Glc . . . . .		2	3		4	3
GlcNH <sub>2</sub> . . . . .		3	3		3	3
NAcGlcNH <sub>2</sub> . . . . .		3	3		3	3
Man . . . . .	3	3	4	3	2	3
Manl . . . . .	4	4	4	4	4	3
Sorb . . . . .		2	3		1	3
Sorbl . . . . .	4	4	4	3	2	3
Fuc . . . . .		3	3		4	3
Cel . . . . .		1	2		3	3
Melb . . . . .		1	3	—	—	—
Lac . . . . .	1	1	3	—	—	—
Sac . . . . .	—	—	1		3	3
Melz . . . . .	—	1	1		3	3
Raf . . . . .		1	3	—	—	1
Blanco . . . . .	4	4	4	4	4	4

(1) Aglutinación observada a los 5 minutos.

En lo que concierne a la lectina de *E. rubrinervia* se observa una inhibición total, irrespectivamente del grupo sanguíneo, sólo con la Gal, sus derivados y los di-o-trisacáridos en los cuales los hidróxilos 3', 4' y 6' no han sido sustituidos; este comportamiento indica que el receptor para esta lectina es probablemente distinto al de *D. lehmannii*.

Resultados análogos de inhibición han sido obtenidos por Mäkelä (13) con *Erythrina indica* y *E. vesperilio* (4 carbohidratos) y por Pérez (21) con *E. edulis* (19 carbohidratos).

El conjunto de datos obtenidos permitirá además ensayar la purificación de estas lectinas haciendo uso de la cromatografía de afinidad utilizando como grupos reactivos los carbohidratos inhibidores (22, 23).

#### *Inhibición de aglutinación de eritrocitos animales.*

Dado que dentro de los eritrocitos animales ensayados sólo los de conejo son aglutinados por el extracto de *E. rubrinervia*, únicamente éstos fueron utilizados en los ensayos de inhibición de aglutinación por carbohidratos. Los resultados (tabla VIII) muestran que: a) la Gal y sus derivados y los di-o-trisacáridos en los cuales este azúcar tiene libres los hidróxilos 3', 4' y 6' inhiben completamente la eritroaglutinación y b) La Glc, sus derivados y los di-o-trisacáridos en que intervienen junto con Gal, actúan como inhibidores. Esta situación es interesante ya que generalmente las lectinas son inhibidas por uno de los dos monosacáridos y no por los dos simultáneamente; el comportamiento aquí descrito posiblemente refleja un tipo de interacción particular entre esta lectina y el o los receptores presentes en la membrana del eritrocito de conejo que en todo caso deben diferir de los receptores en humanos (ver tabla VII).

Por otra parte los ensayos de inhibición de la lectina de *D. lehmannii* (tabla VIII) muestran que sólo la fructosa, la melezitosa (Glc-Sac) y en menor grado la sacarosa, impiden la aglutinación de los eritrocitos de las 4 especies estudiadas; además otros azúcares poseen una acción inhibidora restringida a una o dos especies.

La correlación de los datos no es muy clara pero se pueden anotar varias cosas:

— La acción inhibidora común a los cuatro tipos de eritrocitos se presenta con azúcares, en los cuales interviene una fructosa cuyos hidróxilos 4' y 6' están libres.

— Los eritrocitos de canino y de equino muestran un comportamiento muy similar respecto al efecto de un determinado azúcar (exceptuando N-Ac GalNH<sub>2</sub>, Fuc y Cel); esto apoya la idea de la existencia de receptores bastante parecidos en los eritrocitos de estas dos especies.

— El perfil de inhibición (tipo de azúcares y actividad inhibidora) observado con los eritrocitos de Bufo marinus es bastante complejo y sugiere que los receptores en esta especie deben poseer derivados de Glc, Frc y Gal que intervienen en oligosacáridos con estructuras bastante diferentes a las existentes en las otras especies incluidas en este trabajo.

En este momento es imposible correlacionar estos aspectos con las estructuras de los eventuales receptores, pues se sabe muy poco sobre la constitución de los grupos sanguíneos en animales.

T A B L A V I I I

Inhibición por carbohidratos de la aglutinación de eritrocitos animales<sup>(1)</sup>.

	<i>Erythrina rubrinervia</i>		<i>Dioclea lehmannii</i>		
	Cánido	Canino	Cánido	Báfido	Equino
Arab . . . . .	1	4	4	4	4
Xil . . . . .	1	3	1	4	4
Fruc . . . . .	2	—	—	1	—
Gal . . . . .	—	4	2	1	3
GalNH <sub>2</sub> . . . . .	—	2	3	1	4
NAcGalNH <sub>2</sub> . . . . .	—	1	2	—	4
GalU . . . . .	1	3	2	4	4
Glc . . . . .	—	2	1	—	2
GlcNH <sub>2</sub> . . . . .	—	3	3	1	4
NAcGlcNH <sub>2</sub> . . . . .	—	2	2	—	2
Man . . . . .	1	—	1	—	—
Manl . . . . .	1	2	1	—	3
Sorb . . . . .	1	2	1	2	1
Sorbl . . . . .	1	2	2	—	3
Fuc . . . . .	1	1	3	2	4
Cel . . . . .	1	2	1	1	4
Melb . . . . .	—	3	1	1	4
Lac . . . . .	—	2	1	—	3
Sac . . . . .	1	—	1	—	1
Melz . . . . .	2	—	—	—	—
Raf . . . . .	—	3	2	1	3
Blanco . . . . .	2	4	3	4	4

(1) Aglutinación observada a los 5 minutos.

## CONCLUSIONES

Las especies *Bauhinia picta* (syn *kalbreyeri*), *Tamarindus indica* (semilla inmadura), *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia* poseen lectinas que aglutinan eritrocitos humanos sin mostrar especificidad por ningún grupo sanguíneo; por otra parte *Crotalaria agatifolia* aglutina (aunque débilmente) eritrocitos A<sup>+</sup> y las especies *Cassia indecora*, *Crotalaria* spp y *Ormosia* spp aglutinan preferencialmente eritrocitos O<sup>+</sup>.

Los ensayos realizados utilizando eritrocitos (tripsinizados o no) de seis especies animales confirman la presencia de lectinas en las especies mencionadas, revelan su existencia en las especies *Cassia fruticosa*, *Cassia reticulata*, *Delonix regia*, *Poinciana pulcherrima*, *Abrus fruticulosus* y *Mucuna mutisiana* y permiten clasificar, según Jaffé y Brucher (16), las especies *Dioclea lehmannii* (grupo A) y *Cassia fruticosa*, *Cassia reticulata*, *Poinciana pulcherrima* y *Tamarindus indica* (grupo C).

Las pruebas de inhibición por carbohidratos indican que las lectinas de *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia* actúan sobre receptores diferentes localizados en la membrana de los eritrocitos humanos; sin embargo, para confirmar este punto es necesario demostrar las interacciones con los receptores aislados y purificados.

El comportamiento análogo de los eritrocitos caninos y equinos frente a las diversas lectinas en los ensayos de aglutinación y de inhibición, junto con otras evidencias (9, 10), sugiere la existencia de receptores muy similares en los eritrocitos de estas especies.

### *Agradecimientos.*

La realización de este trabajo fue posible gracias a la colaboración del Banco de Sangre "Moris Gutt", del doctor Ruben D. Velásquez, Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional, de los doctores Hernando García Barriga y Roberto Jaramillo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional.

El apoyo financiero proviene del Departamento de Química de la Universidad Nacional y del Programa Multinacional de Química, auspiciado por la OEA.

## BIBLIOGRAFIA

1. LIENER I. E. (ed.). "Toxic constituents of Plants Foodstuffs". New York, Academic Press, 1969.
2. JAFFE W. G. "Hemagglutinins" en Liener I. E. (ed). "Toxic constituents of Plants Foodstuffs". New York, Academic Press, págs. 69-101. 1969.
3. LIENER I. E. *J. Agr. Food Chem.*, 22. 17-22, 1974.
4. LIS H., SHARON H. *Ann. Rev. Biochem.*, 42. 541-574, 1973.
5. BURGER M. M. *Fed. Proc.*, 32. 91-101, 1973.
6. HUGHES R. C. "Membrane Glycoproteins", London, Butterworths, págs. 135-151, 1976.
7. NAVARRO YOLANDA DE., PÉREZ G. *Rev. Col. Quím.*, 8, 1978.
8. STEYERMARK A. L. "Quantitative organic microanalysis". 2ª Ed. New York, Academic Press, pág. 205, 1961.
9. PÉREZ G. *Rev. Col. Quím.*, 6. 13-26, 1976.
10. TOMS G. C., WESTERN A. "Phytohaemagglutinins". En Harborne J. B., Boulter D., Turner B. L. (Ed.). "Chemotaxonomy of the Leguminosae". New York, Academic Press, págs. 367-462, 1971.
11. TIGGELMAN-VAN KRUGTEN, V. A. H., OSTENDORF, DOYER C. M. y COLLIER W. A. *Ant. Leeu. J. Micro. Serol.*, 22, 289, 1956.
12. RENKONEN K. O. *Ann. Med. Biol. Fenn.*, 26, 66-72, 1948.
13. MAKELA O. *Ann Med. Exp. Biol. Fenn.*, 35, suppl. 11, 1-133, 1957.
14. BOYD W. C., WASZCZENKO-ZACHARCZENKO E., GOLDWASSER S. M. *Transfusión 1*, 374-382, 1961.
15. DE GÓMEZ V., PÉREZ G. *Sixth Annual Miami Winter Symposia*, Miami, University of Miami, p. 88, 1974.
16. JAFFÉ W. G., BRUCHER O. *Arch. Lat. Nutr.* 22, 267-281, 1972.
17. SOTELO A. *Comunicación personal*, 1977.
18. MARTIN T., BOMCHILL G. *Vox Sang.*, 11, 54-58, 1966.
19. SHARON N. "Complex Carbohydrates", London, Addison-Wesley, p. 229, 1975.
20. HUGHES R. C. "Membrane Glycoproteins", London, Butterworths, págs. 74-75, 1976.
21. PÉREZ G. *Resultados no publicados*, 1977.
22. CUATRECASAS P. *J. Biol. Chem.*, 245, 3059-3065, 1970.
23. HOREJSY V., KOCOUREK J. *Biochem. Biophys. Acta.*, 297, 346-351, 1973.