UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA

EXTRACCION Y ENSAYO DE UNA LECTINA DEL PORO (*Erythrina costaricensis*)

TESIS DE GRADO PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE LICENCIADA EN BIOLOGIA

CLARA ISABEL NANNE ECHANDI

1984

EXTRACCION Y ENSAYO DE UNA LECTINA DEL PORO
(*Erythrina costaricensis*)

CLARA ISABEL NANNE ECHANDI

TESIS PRESENTADA EN LA ESCUELA DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

APROBADA

Lic. Marco Antonio Gómez Leiva	Director de Tesis
Dr. Ramiro Barrantes Mesén	Miembro del Tribunal
Dr. José Miguel Jiménez Sáenz	Miembro del Tribunal
Dr. Jorge Arturo Rodríguez Barquero	Miembro del Tribunal
Dr. Róger Bolaños Herrera	Miembro del Tribunal

DEDICATORIA

A mis padres.

A mi esposo.

AGRADECIMIENTO

Quiero hacer patente mi agradecimiento a las siguientes personas que en una u otra forma hicieron posible que este trabajo fuera coronado con éxito:

Al Lic. Marco A. Gómez Leiva, padrino de esta tesis. Al Dr. Róger Bolaños Herrera, quien con su vasta experiencia aportó importantes ideas. Al Dr. Jorge A. Rodríguez Barquero, por su ayuda en el desarrollo experimental. Al Dr. José M. Jiménez Sáenz, por su valiosa cooperación. Finalmente a mis compañeros del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, José M. Jiménez Ortega y Alfredo Arce Gutiérrez los cuales colaboraron en forma desinteresada y entusiasta en la realización de este trabajo.

Diciembre de 1984

Clara Isabel Nanne Echandi

RESUMEN

Se encontró actividad de lectina en la semilla de *Erythrina costaricensis*. La solución de lectina es inespecífica porque aglutinó todos los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO y del factor Rh_o (D) positivo y negativo.

La solución de lectina diluída 1:8 aglutinó todos los glóbulos rojos en estudio, pero a una dilución 1:16 ya no hubo actividad aglutinante. Se demostró una aglutinación débil con la solución de lectina sin diluir con los glóbulos rojos de conejo, pero no con los de rata, perro, carnero y caballo.

La galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa actuaron como inhibidores de la actividad aglutinante.

Se pudo determinar además que la galactosa fue el carbohidrato de menor capacidad inhibitoria, la N-acetil galactosamina, de potencia inhibitoria intermedia y la lactosa de mayor capacidad inhibitoria.

Se repitió el experimento a varios pH (6, 7, 8, 9), no encontrándose variaciones significativas en cuanto al poder aglutinante de la solución de lectina y el poder inhibitorio de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa.

La titulación del efecto inhibitorio de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa en el ámbito de pH de 6 a 9, mostró resultados erráticos en la concentración de 50 mM del inhibidor. Se pudo observar ausencia de inhibición para varios grupos sanguíneos a diferentes pH

con la galactosa, no así con la N-acetil galactosamina, en la que en un sólo caso, del grupo AB, Rh_o (D) positivo hubo ausencia de inhibición a pH 6. Con la lactosa hubo efecto inhibitorio con todas las concentraciones con que se trabajó y en los pH estudiados.

Se realizó la electroforesis en gel de acrilamida del extracto crudo de la semilla, en la cual se observó la presencia de más de diez bandas claramente definidas.

La determinación del punto isoeléctrico de la lectina por el método de electroenfoque permitió determinar que en el extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis* hay dos lectinas galactosafílicas con puntos isoeléctricos de 4,39 y 5,80, con idéntica especificidad sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO y del factor Rho (D) positivo y negativo.

INDICE GENERAL

	PAGINA
Hoja de Aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Resumen	v
Indice General	vii
Indice de Cuadros	ix
Indice de Figuras	x
I. INTRODUCCION	1
1.1. Historia	1
1.2. Estructura	3
1.3. Modo de Acción	4
2. MATERIALES Y METODOS	9
2.1. Recolección de las semillas	9
2.2. Preparación de los extractos de las semillas	9
2.3. Determinación de la concentración de proteínas en el liofilizado por medio del método de biuret	9
2.4. Poder de aglutinación	10
2.5. Titulación del poder aglutinante	11
2.6. Efecto inhibitorio de diferentes carbohidratos sobre la aglutinación	11
2.7. Titulación del poder inhibitorio de diferentes carbohidratos	12

PAGINA

2.8. Electroforesis en Gel de acrilamida ---------- 12

2.9. Efecto del pH sobre el poder aglutinante de la solución de lectina y sobre el poder inhibitorio de diferentes carbohidratos ---------- 14

2.10. Determinación del punto isoeléctrico de la lectina por el método de electroenfoque ---------- 15

3. RESULTADOS ---------- 16

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES ---------- 32

5. BIBLIOGRAFIA ---------- 39

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	Poder de aglutinación de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los glóbulos rojos de humano, rata, perro, caballo, carnero y conejo, al 2 por ciento en solución salina ----------	21
2	Titulación de la actividad de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivos y negativos ----------	22
3	Inhibición de la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o (D) positivos y negativos, por diversos carbohidratos ----------	23
4	Titulación de la capacidad de inhibición de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa 0,1 M sobre la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivos y negativos ---	24
5	Titulación de la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivo, a pH 6, 7, 8, y 9 ----------	25
6	Titulación de la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o (D) negativo a pH 6,7,8 y 9 ----------	26
7	Titulación del efecto inhibitorio de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa expresadas en milimoles sobre la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* con los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivo en diferentes pH ----------	27
8	Titulación del efecto inhbitorio de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa, sobre la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* con los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rho(D) negativos en diferentes pH ----------	28

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Electroforesis en acrilamida del extracto crudo de las semillas de *Erythrina costaricensis* ----------	29
2	Isoelectroenfoque de 100 mg de liofilizado del extracto de *Erythrina costaricensis* ----------	30
3	Isoelectroenfoque de 25 mg del liofilizado del extracto de *Erythrina costaricensis* ----------	31

I. INTRODUCCION

1.1. HISTORIA

El término lectina deriva del latín *"legere"* que significa escoger o seleccionar. Este término fue usado por primera vez por Boyd y Shapleigh en 1954 (13).

Los estudios iniciales sobre las lectinas se basaron fundamentalmente en su acción aglutinante y se les llamó aglutinas vegetales, hemaglutininas, fitohemaglutininas o fitoaglutininas (36).

La primera descripción de una lectina en la literatura procede de la Universidad de Dorpart, Estonia, en el año de 1888 por Stillmark, quien trabajando con extractos de la semilla de *Ricinus communis* observó que tenían la capacidad de aglutinar glóbulos rojos. La parte del extracto responsable de la acción, era una proteína a la que llamó ricina (59). Poco tiempo después, en la misma Universidad, trabajando con semillas de *Abrus precatorius* se demostró la presencia de una nueva aglutinina a la que se llamó abrina (56).

La primera purificación de una lectina se hizo del frijol *Concanavalia ensiformes*. Esta lectina de origen vegetal ha sido la más ampliamente estudiada (60).

En el reino vegetal, las semillas de leguminosas son muy ricas en lectinas, por ejemplo en el frijol de soja *Glycine soja*, se alcanzan

concentraciones de 1,2 a 2,6 por ciento por peso de las proteínas solubles (49).

Actualmente se han aislado lectinas en tejidos animales de invertebrados y de vertebrados (5). También se les ha encontrado y aislado del veneno de las serpientes como es el caso de la *Bothrops atrox* y la *Lachesis* muta (23,26,27). Recientemente han sido detectadas dos lectinas solubles en el músculo esquelético del hombre (21).

Erlich, utilizando la ricina y la abrina, demostró algunos de los principios básicos de la inmunología actual. En 1891 reportó que los ratones se hacían inmunes a una dosis letal de ricina mediante pequeñas inyecciones subcutáneas repetidas de la toxina. También demostró que el suero de un ratón inmune podía neutralizar la toxicidad de la ricina y aún más, que esta acción era específica, ya que la antiabrina, que se desarrollaba en el suero de un animal inmunizado con abrina, no tenía la capacidad de neutralizar los efectos tóxicos de la ricina, lo mismo que la antirricina era incapaz de neutralizar a la abrina (19).

El conocimiento que se tiene en la actualidad de los procesos biológicos mediados por los carbohidratos constituyentes de la membrana celular se debe fundamentalmente a las lectinas (56).

La capacidad que tienen las lectinas de unirse a carbohidratos en forma específica, ha sido ampliamente utilizada como instrumento en el

estudio de la arquitectura de la membrana celular. También se les ha usado para el estudio de los cambios que se producen sobre la superficie celular en la transformación maligna. Otro uso que se les ha dado, ha sido para el aislamiento y detección de glicoproteínas y compuestos con estructura de polisacáridos (14).

1.2. ESTRUCTURA

Estructuralmente las lectinas se consideran proteínas simples o glicoproteínas con capacidad para enlazar carbohidratos; están desprovistas de actividad enzimática hacia los azúcares con los que se unen y no requieren de la presencia de grupos hidroxilo libres para efectuar dicha unión. Se ha establecido que su origen no es inmunológico (31).

Los residuos de carbohidratos de la mayoría de las lectinas consideradas como glicoproteínas, corresponde a un porcentaje por peso que varía desde un 1 a un 27 por ciento (56). Sin embargo, estos no son términos absolutos, ya que la lectina de la papa *Solanun tuberosum*, está constituída por un 50 por ciento de carbohidrato. Esta es una de las lectinas más glicosiladas que se conocen (3). Hasta hace poco, se creía que la acción aglutinante de las lectinas dependía del residuo de carbohidrato de las mismas. Este concepto ha sido modificado, en el sentido de que la acción aglutinante no depende necesariamente del residuo de carbohidrato. Por ejemplo, se ha encontrado que la lectina desglicosilada de la papa, presenta una actividad aglutinante muy similar a la lectina sin modificar; ambas se unen en forma idéntica al inhibidor N', N",

N''' tri N acetilquitotriosa. (17). Otro caso ilustrativo es el de la concavanalina A que no contiene carbohidratos en su estructura y que sin embargo tiene acción aglutinante (60).

Las lectinas pueden dividirse en dos grandes grupos, uno de lectinas solubles que pueden ser extraídas fácilmente, las cuales son las más abundantes y otro constituído por lectinas que forman parte de membranas celulares. Las lectinas estructuralmente son dímeros o polímeros cuaternarios con sitios de enlace específicos para carbohidratos. Muchas lectinas están formadas por subunidades idénticas con sitios de unión también idénticos. Otras son heteropolímeros con sitios de enlace diferentes (39).

Se supone que cuando la lectina se fija en más de un sitio con los carbohidratos de la membrana celular que se encuentran expuestos hacia el exterior, se forman enlaces débiles que pueden producir cambios en la morfología de la membrana celular (14).

1.3. MODO DE ACCION

La membrana celular puede considerarse como un mosaico fluído de fosfolípidos y proteínas, el enlace de la lectina con los carbohidratos, interfiere con la movilidad de las glicoproteínas. Estos enlaces pueden intervenir en la organización de diversos procesos celulares tales como la morfogénesis en embriones o la fagocitosis celular (5).

Para demostrar la presencia de lectinas en un extracto, se utiliza la capacidad que tienen éstas de interactuar con células. Mezclando suspensiones celulares con el extracto, si hay lectinas, al fijarse éstas a las células se produce el fenómeno de la aglutinación. Las primeras aglutinaciones se realizaron con glóbulos rojos; posteriormente se utilizaron otros tipos celulares como son los linfocitos, fibroblastos, espermatozoides, bacterias y hongos (18,25,36). También se ha encontrado que algunas lectinas, tienen la capacidad de aglutinar preferencialmente células malignas (20).

Landsteiner en 1947, encontró una lectina que aglutinaba en forma diferencial los glóbulos rojos de diferentes especies animales (34). Otros autores clasificaron las lectinas en específicas e inespecíficas, dependiendo de si aglutinaban un grupo sanguíneo determinado o si por el contrario aglutinaban todos los grupos. La mayoría de las lectinas que se han descrito hasta el presente pertenecen a la categoría de no específicas en cuanto a su acción aglutinante sobre los glóbulos rojos humanos (56).

Se supone que la inducción de la mitosis delos linfocitos tratados previamente con ciertas lectinas, se debe a fenómenos que afectan la membrana celular, en la cual las moléculas de lectina unidas a los carbohidratos se concentran progresivamente en un fenómeno llamado agregación en mosaico o encapsulamiento. Estos procesos estimularán el inmenso número de reacciones moleculares que llevan a la multiplicación y transfor

mación celular (41). Se ha podido determinar que en algunos tejidos embrionarios y fetales de mamíferos, algunas lectinas se encuentran aumentadas; esto sugiere que las mismas desempeñan algún papel, aún desconocido, en el reconocimiento celular, y en la orientación para la formación de tejidos durante el desarrollo (14).

Se han utilizado algunas lectinas en oncología, para la identificación y aislamiento de células epidérmicas en diferentes estadíos de diferenciación, tanto normales como anormales (50). Se ha podido diferenciar por medio del uso de lectinas, líneas celulares embriónicas de las extraembriónicas (48). La molécula de lectina, se une a receptores específicos de la membrana celular, análogos o posiblemente idénticos a los sitios receptores que normalmente funcionan en la superficie celular, enlazando ciertas hormonas como la insulina (30). De hecho, las lectinas son capaces de imitar la acción de la insulina sobre algunas células (15).

Se ha establecido que para que las lectinas puedan mantener su actividad biológica se requiere de la presencia de ciertos iones metálicos. Algunas de ellas requieren de cationes divalentes en forma absoluta para poder enlazar carbohidratos (1,37). La mayoría de las lectinas necesitan de combinaciones de iones Ca^{++}, Mn^{++}, ó Zn^{++}. La lectina de *Dolichos biflorus* fue una de las primeras de las cuales se pudo demostrar que requiere de sólo un catión divalente, el Mn^{++}, para poder ejercer su acción (10).

Una importante característica de las lectinas es que su acción aglutinante puede ser inhibida mediante diversos carbohidratos, especialmente monosacáridos y sus derivados. En muchos de los organismos estudiados hasta el momento, se han encontrado lectinas específicas para galactosa, por lo que comúnmente se denominan galactosafílicas (32,42,64).

Se han identificado relativamente pocas lectinas específicas para el ácido N-acetilneuramínico. La primera lectina específica para este compuesto fue la limulina que se detectó en la hemolinfa del cangrejo *Limulus polyphemus* (38). Posteriormente se encontró otra lectina con la misma especificidad en la hemolinfa del cangrejo *Carcinoscorpius cauda*, la cual se denominó carcinoscoporina (9). De las semillas de *Vicia cracca* y de *Lathyrus tingitanus* se han aislado dos lectinas con especificidad a azúcares diferentes, manosa y glucosa (6,53). En 1958 Monge (40) en Costa Rica, hace un primer estudio sobre la capacidad hemaglutinante de los extractos de las semillas de 7 plantas de la familia *Leguminosae*. Trabajó con los extractos salinos de las semillas de *Phaseolus lunatus L.* var. *macrocarpus* Benth f. "Lima grande", *Phaseolus lunatus* var. *macrocarpus* Benth. f. "Trepadora", *Phaseolus vulgaris L.*, *Phaseolus coccineus L.*, *Dolichos lablab*, *Erythrina berteroana* Urb. y *Mimosa pigra L.* Estos extractos fueron probados con sangres humanas de los grupos sanguíneos del sistema ABO, MN y de los subgrupos A_1 y A_2. El encontró que los extractos de *Phaseolus lunatus* var. *macrocarpus Benth f. "Lima Grande"* y *Mimosa pigra L.* no poseen aglutininas contra los diferentes grupos sanguíneos humanos. Los extractos de *Phaseolus vulgaris L.*, *Phaseolus*

coccineus L., *Erythrina berteroana y Dolichos lablab* aglutinaban los 4 grupos sanguíneos. Encontró que el extracto de *Phaseolus lunatus* var. *macrocarupus*, *Benth* F. "*Trepadora*", aglutinaba en forma específica los glóbulos rojos con el aglutinógeno Al, pero no pudo concentrar el extracto para mejorar su potencia aglutinante. También probó estos extractos obeniendo resultados variables con la sangre de algunos animales como el conejo, carnero, buey, cuilo, hamster, rata, pollo y paloma.

El objetivo de este informe es el de presentar los resultados de un estudio tendiente a detectar y caracterizar las lectinas en la semilla del poró (*Erythrina costaricensis*).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Recolección de las semillas

Se recolectaron semillas maduras de arbustos de *Erythrina costaricensis* en las localidades de Santa Ana, Atenas y Esparza, en los meses que corresponden a la época seca del año.

2.2. Preparación de los extractos de las semillas

Se lavaron 80 g de semillas secas y se dejaron en agua destilada 24 horas a 5°C. Se licuaron en 500 ml de solución salina de NaCl al 0,9 por ciento. Haciendo uso de un embudo de vidrio se filtró el homogenizado a través de gasa. El filtrado se centrifugó a 10.000 rpm durante una hora hasta tomar un aspecto transparente.

Para precipitar las proteínas del filtrado se mezcló éste con cuatro volúmenes de acetona. El precipitado se recogió después de centrifugar 10 minutos a 10.000 rpm y luego se dejó a temperatura ambiente 8 horas con el fin de eliminar la acetona. Se disolvió el precipitado libre de acetona en tres volúmenes de solución salina de NaCl al 0,9 por ciento y se centrifugó 30 minutos a 10.000 rpm. Se liofilizó el sobrenadante y se colocó éste a -20 °C para su uso posterior.

2.3. Determinación de la concentración de proteínas en el liofilizado por medio del método de biuret

Esta determinación se llevó a cabo con el fin de trabajar con una

concentración fija de proteínas en la muestra a analizar.

Preparación del reactivo:

El reactivo de biuret se preparó según el procedimiento citado por Oser (45).

Ensayo de la concentración de proteína:

En 6 tubos de ensayo de 13 x 100 mm se colocaron 0,1 - 0,2 0,5 - 1,0 y 1,4 ml respectivamente de una solución de 20 mg de albúmina sérica (fracción V de Cohn), a los cuales se les agregó 0,1 ml de desoxicolato de sodio al 10% en solución salina. El volumen de cada tubo se ajustó a 1,4 ml con solución salina. En tres tubos adicionales se colocaron 2,4 ml de liofilizado en solución salina a una concentración de 3,75 mg/ml de liofilizado. Después de agregar 1,5 ml del reactivo de biuret a todos los tubos, se mezcló por inversión y esperó 30 minutos. Se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 35. Una vez trazada la curva estándar se determinó con ésta la concentración de proteínas en las diferentes muestras.

2,4. Poder de aglutinación

Para evidenciar el poder de aglutinación de la solución de lectina sobre los glóbulos rojos humanos del sistema ABO se procedió de la siguiente manera. En una placa de ensayo a la gota se colocaron 12,5 µl. de solución salina, 25 µl. de solución de lectina (5 mg/ml de proteína

total) y por último una suspensión de glóbulos rojos lavados al 2 por ciento en solución salina de los grupos sanguíneos A,B,AB,O, $Rh_o(D)^+$ y Rh_o (D)- respectivamente. Se observó la aparición de aglutinación en cada caso (16).

El proceso se repitió con glóbulos rojos de rata, perro, caballo, carnero y conejo, usando las mismas concentraciones citadas anteriormente.

2.5. Titulación del poder aglutinante

La titulación de la aglutinación se llevó a cabo en un equipo de microtitulación (Cooke Laboratory Products, Virginia, U.S.A.). Se hicieron diluciones seriadas de alicuotas de 50 µl de solución de lectina (5 mg/ml de proteína total) al doble con solución salina.

Estas se mezclaron con 25 µl de una suspensión de glóbulos rojos al 2 por ciento en salina de todos los grupos sanguíneos del sistema ABO, Rh_o (D)+ y Rh_o (D)-. Al cabo de una hora se hicieron las correspondientes lecturas, considerando positiva la aglutinación por la aparición de un casquete de glóbulos rojos en el fondo de las depresiones de la placa y negativa por la formación de un botón de glóbulos rojos (16).

2.6. Efecto inhibitorio de diferentes carbohidratos sobre la aglutinación

En una placa de ensayo a la gota se colocaron 25 µl. respectiva-

mente de los siguientes carbohidratos 0,1 M disueltos en salina: L(-) Fucosa, D(+) Galactosa, D(+) Glucosa, D(+) Manosa D(+) Fructosa, N acetil D manosamina, N acetil D galactosamina, D(+) Xilosa, D Lactosa y D Sacarosa. Luego se agregó, agitando 12,5 µl de solución de lectina (5 mg/ml de proteína total). Después de 1 hora en reposo se agregó 12,5 µl de una suspensión de los glóbulos rojos humanos al 2 por ciento. Después de una hora a temperatura ambiente se efectuaron las lecturas correspondientes a la aglutinación (53).

2.7. Titulación del poder inhibitorio de diferentes carbohidratos

En el equipo de microtitulación se colocaron 50 µl de la solución de lectina (5 mg/ml de proteína total) y se hicieron diluciones seriadas al doble con 50 µl de carbohidrato. Después de 1 hora se incorporaron con agitación 25 µl de glóbulos rojos humanos al 2 por ciento.

Al cabo de una hora se procedió a las correspondientes lecturas de la aglutinación (53). Todas las pruebas de aglutinación y de inhibición fueron hechos por triplicado.

2.8. Electróforesis en gel de acrilamida (33)

Preparación de los geles:

Con anterioridad a la corrida se prepararon las siguientes soluciones que se mantuvieron en refrigeración. Solución A: (pH 8,8-9,6), 24 ml HCl, 1N, 18,5 g TRIS (TRIS-hidroximetil-amino-metano), 0,12 ml TEMED (N, N', N' tetrametiletilendiamina) en 100 ml de H_2O destilada.

Solución B: (pH 6,6-6,8): 48 ml HCl 1N, 5,98 g TRIS, 0,46 ml TEMED en 100 ml H_2O destilada .

Solución C: 29 g Cyanogum en 100 ml de H_2O destilada.

Solución D: 25 g Cyanogum en 100 ml H_2O destilada.

Solución E: 4 mg Riboflavina en 100 ml H_2O destilada.

Solución F: 41 g Sacarosa en 100 ml de H_2O destilada.

Solución G: 0,14 Persulfato de amonio en 100 ml H_2O destilada.

Gel de corrida (7 por ciento de acrilamida):

Se obtuvo mezclando las soluciones A, C y G en proporción 1:1:2 y colocándola al vacío por 5 minutos. Se usaron tubos de vidrio de 100 mm de largo con un diámetro interno de 6 mm, los cuales se llenaron con 2,4 ml de la solución antes citada, dejando transcurrir 20 minutos hasta que polimerizara.

Gel espaciador (3 por ciento de acrilamida):

Se obtuvo mezclando las soluciones B, D, E, F y H_2O destilada en una proporción de 1:1:1:4:1. Se colocó 0,1 ml de solución espaciadora sobre el gel de corrida polimerizado en cada tubo esperando 20 minutos hasta su polimerización.

Gel de muestra:

Se obtuvo mezclando las soluciones B,D,E,H_2O destilada y F en una

proporción de 1:1:1:1:4. Se colocó 0,15 ml de gel de muestra sobre el gel espaciador, procediendo inmediatamente a aplicar 10 µl de la solución de lectina (20 mg/ml de proteína total) con 0,01 ml de azul de bromofenol al 0,1% en cada tubo.

Una solución tampón de TRIS 0,025 M y Glicina a 0,192 M, pH 8,3 se usó para las celdas de los electrodos. Se aplicó una corriente directa de 5 mA por tubo, deteniendo la corrida antes de que el indicador saliera del gel. Una vez concluida la corrida los geles se fijaron en ácido tricloroacético al 10% durante 15 minutos.

Tinción de los geles:

Una vez fijados los geles se colocaron en una solución reveladora de azul de Coomasie al 0,25 por ciento en ácido tricloroacético al 50 por ciento durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se trasladaron a una solución decolorante (75 ml de ácido acético glacial, 50 ml de metanol y 875 ml de H_2O destilada), durante 24 horas, desechando la solución teñida por la solución nueva, cuatro veces hasta obtener una buena definición de las bandas.

2.9. Efecto del pH sobre el poder aglutinante de la solución de lectina y sobre el poder inhibitorio de diferentes carbohidratos:

A partir de una solución tampón compuesta por TRIS-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y $CaCl_2$ 40 mM, pH 7,4, se varió el pH con NaOH ó HCl concen

trados hasta obtener los valores de pH 6, 7, 8 y 9. Todo el procedimiento de los puntos 3, 4 y 5 se repitió a los cuatro valores de pH. Para ésto, la suspensión al 2% en salina de glóbulos rojos y la solución de lectina, se hicieron en la solución tampón correspondiente a cada pH (57).

2.10. Determinación del punto isoeléctrico de la lectina por el método de electroenfoque (58).

Preparación y manejo de la columna:

Se utilizó una columna LKB de 440 ml (Tipo 8102) con una concentración final de 1% (v/v) de los anfolitos acarreadores (Ampholine), con un ámbito de pH de 3,5 a 10 y de 5 a 7, en una gradiente de densidad de sacarosa.

En el compartimento del electrodo central, se colocó la solución catódica (0,1 g de NaOH 30 g de sacarosa y agua destilada para 50 ml). Haciendo uso de un agitador de gradientes LKB, se llenó la columna con las siguientes soluciones:

a. Solución de alta densidad: formada por 28 g de sacarosa, 7,2 g de urea, 1,87 ml de anfolito estéril en un volumen de 60 ml de agua destilada.

b. Solución de baja densidad: formada por 7,2 g de urea, 0,62 ml de anfolito estéril, 25 mg de extracto crudo de lectina liofilizado en un volumen de 60 ml de la solución. Se estratificó sobre la parte

superior de la gradiente, la solución ácida (0,2 ml de ácido sulfúrico concentrado en 60 ml de agua destilada. El tiempo de corrida fue de 72 horas, a una temperatura de 5 °C y a un potencial final de 450 V. Al final de la corrida se eluyó la gradiente de la columna, usando una bomba peristáltica, a una velocidad de 15 ml/h. Se recogieron las fracciones de 2,5 ml. A cada una de ellas se les midió la densidad óptica a 280 nm y el pH. Una alícuota de 0,10 ml de cada fracción se diluyó 1:10 con solución salina y a cada una de estas diluciones se le agregó una suspensión de glóbulos rojos al 2 por ciento de cada uno de los grupos sanguíneos humanos. Se confirmó la presencia de lectina, en aquellos tubos en donde se formó un botón que no desapareció con la agitación.

3. RESULTADOS

Como paso previo para realizar el diseño experimental de este trabajo, se procedió a determinar la capacidad de aglutinación de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis*, a una concentración de 5 mg/ml de proteína total, sobre los glóbulos rojos humanos de los grupos A,B, AB, y O, así como también por el factor Rh_o(D) positivo y negativo. Se pudo determinar que la solución de lectina aglutinó en forma inespecífica todos los glóbulos rojos estudiados.

Se procedió a determinar el poder de aglutinación de la solución de lectina (5 mg/ml de proteína total) sobre los glóbulos rojos de los si

guientes animales: rata, perro, carnero, caballo y conejo, utilizando los glóbulos a una concentración del 2 por ciento. Hubo aglutinación débil con la solución de lectina sin diluir sobre los glóbulos rojos de conejo, pero no hubo aglutinación sobre los demás (Cuadro 1).

Como la lectina de *Erythrina costaricensis* aglutinó a todos los glóbulos rojos humanos, se procedió a titular la capacidad aglutinante, utilizando diluciones seriadas desde 1:2, hasta 1:64, de la solución de lectina de 5 mg/ml de proteína total. Se encontró que la lectina diluida 1:8, aglutinó a todos los glóbulos rojos en estudio, pero a una dilución 1:16 ya no hubo capacidad aglutinante (Cuadro 2).

Como cuarto paso, se procedió a investigar la posible acción inhibitoria de varios carbohidratos e inositol, a una concentración 0,1 M, sobre la actividad aglutinante de la lectina en estudio, sobre los glóbulos rojos humanos de los grupos sanguíneos ya mencionados. Se encontró que la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa, actúan como inhibidores de la actividad aglutinante (Cuadro 3).

Se procedió a repetir este experimento para todos los grupos sanguíneos a pH 6, 7, 8 y 9, obteniéndose resultados idénticos.

En el Cuadro 4, se presenta la titulación de la capacidad inhibitoria de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa 0,1 M sobre la capacidad aglutinante de la solución de lectina (5 mg/ml de proteína total) sobre todos los grupos sanguíneos del sistema ABO, todos ellos con

factor Rh_o(D) positivo o negativo. El análisis del cuadro permite deducir que la solución de galactosa 0,1 M es la de menor capacidad inhibitoria ya que sólo es capaz de inhibir la aglutinación en la dilución 1:2 y en dos instancias, una para el grupo B, Rh_o(D) positivo, en una dilución 1:4. En otro caso, para el grupo AB, Rh_o (D) negativo hubo inhibición en un título de 1:4.

Con la solución de N-acetil galactosamina 0,1 M, se obtuvo inhibición para todos los grupos sanguíneos en la dilución 1:4. Con diluciones mayores, para el grupo AB y O, ambos Rh_o(D) positivos, se obtuvo inhibición en una dilución 1:8. Con los grupos A y B, ambos Rh_o (D) negativos, se obtuvo inhibición en una dilución 1:8.

En el Cuadro 5 y en el Cuadro 6, se presenta el resultado de la titulación de la actividad aglutinante de la solución de lectina (5 mg/ml de proteína total) sobre los glóbulos rojos de los grupos sanguíneos del sistema ABO, y de Rh_o (D) positivo y negativo, a pH 6,7, 8 y 9.

Se obtuvo aglutinación idéntica en todos los valores de pH y para todos los grupos sanguíneos en una dilución 1:8, con la excepción del grupo O, Rh_o (D) negativo, con el cual se obtuvo aglutinación a una dilución 1:16 en todos los rangos de pH estudiados, diferencia que no es estadísticamente representativa.

Los Cuadros 7 y 8, presentan la titulación del efecto, inhibitorio

de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa, todos a una concentración 0,1 M sobre la actividad aglutinante de la solución de lectina (5 mg/ml de proteína total) sobre los glóbulos rojos de los grupos sanguíneos del sistema ABO, Rh_o (D) positivo y negativo, a pH 6, 7, 8 y 9. En ambos casos, para determinar la sensibilidad de la capacidad inhibitoria de los carbohidratos, se trabajó con una dilución mayor, exactamente el doble de la utilizada en el experimento inicial (Cuadro 3). La concentración inicial fue de 100 mM y en la de los Cuadros 7 y 8 fue de 50 mM. A esta dilución hubo una actividad inhibitoria errática e inespecífica a los distintos rangos de pH con que se trabajó. Se pudo observar ausencia de inhibición para varios grupos sanguíneos a diferentes pH con la galactosa, no así con la N-acetil galactosamina, en la que en un sólo caso del grupo AB, Rh_o (D) positivo, en que hubo ausencia de inhibición a pH 6.

Con la lactosa hubo efecto inhibitorio con todas las concentraciones con que se trabajó y en todos los pH.

Se procedió a realizar la electroforesis en gel de acrilamida, del extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis*. Se pudo observar la presencia de más de diez bandas claramente definidas, cuya naturaleza química podrá ser elucidada en una investigación posterior (figura 1).

La determinación del punto isoeléctrico de la lectina por el método

de electroenfoque, permitió determinar que en el extracto crudo de *Erythrina costaricensis*, hay dos lectinas (Figura 2 y 3) con puntos isoeléctricos de 4,39 y 5,80, con idéntica especificidad sobre los grupos sanguíneos humanos, inhibidas por la galactosa y cuya caracterización podrá realizarse en una investigación posterior.

Cuadro 1. Poder de aglutinación de la solución de lectina *Erythrina costaricensis* sobre los glóbulos rojos de humano, rata, perro, caballo, carnero y conejo, al 2 por ciento en solución salina.

Glóbulos rojos al 2 por ciento en solución salina	Aglutinación
Humano	+
Rata	-
Perro	-
Caballo	-
Carnero	-
Conejo	±

+ : aglutinación.

- : ausencia de aglutinación.

± : aglutinación débil con la solución de lectina sin diluir.

Cuadro 2. Titulación de la actividad de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o (D) positivos y negativos.

Dilución de la solución de lectina	GRUPO SANGUINEO							
	Rh_o (D)+				Rh_o (D)-			
	A	B	AB	O	A	B	AB	O
1:2	+	+	+	+	+	+	+	+
1:4	+	+	+	+	+	+	+	+
1:8	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : aglutinación

- : ausencia de aglutinación

Cuadro 3. Inhibición de la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivos y negativos, por diversos carbohidratos.

CARBOHIDRATO (O, IM)	GRUPO SANGUINEO							
	Rh_o(D)+				Rh_o(D)-			
	A	B	AB	O	A	B	AB	O
Fucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil manosamina	+	+	+	+	+	+	+	+
N-acetil galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : aglutinación.

- : inhibición de la aglutinación.

Cuadro 4. Titulación de la capacidad de inhibición de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa, O,IM sobre la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivos y negativos.

GRUPOS SANGUINEOS	Galactosa 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32	N-acetil galactosamina 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32	Lactosa 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32
Rh_o (D) +			
A	- + + + +	- - + + +	- - + + +
B	- - + + +	- - + + +	- - + + +
AB	- + + + +	- - + + +	- - - + +
O	- - + + +	- - - + +	- - - + +
Rh_o (D) -			
A	- + + + +	- - + + +	- - - + +
B	- + + + +	- - + + +	- - - + +
AB	- - + + +	- - + + +	- - + + +
O	- + + + +	- - + + +	- - + + +

+ : aglutinación

- : inhibición de la aglutinación

Cuadro 5. Titulación de la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, $Rh_o(D)$ positivo, a pH 6, 7, 8, y 9.

Título de la lectina	Grupo Sanguíneo	*A				B				AB				O			
	pH	6	7	8	9	6	7	8	9	6	7	8	9	6	7	8	9
1:2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:8		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : aglutinación

- : ausencia de aglutinación

* : glóbulos rojos al 2%

Cuadro 6. Titulación de la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) negativo a pH 6, 7, 8, y 9.

Título de la lectina	Grupo Sanguíneo	A				B				*AB				O			
	pH	6	7	8	9	6	7	8	9	6	7	8	9	6	7	8	9
1:2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:8		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:16		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
1:32		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : aglutinación

- : ausencia de aglutinación

* : glóbulos rojos al 2%

Cuadro 7. Titulación del efecto inhibitorio de la galactosa, N-acetil galactosamina y lactosa expresado en milimoles sobre la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* con los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o(D) positivo en diferentes pH_s.

Grupo sanguíneo	Cantidad inhibitoria de carbohidrato (milimoles)											
	Galactosa				N-acetilgalactosamina				Lactosa			
pH	6	7	8	9	6	7	8	9	6	7	8	9
A	50	50	50	50	25	50	25	25	25	50	25	25
B	50	-	50	50	25	25	50	25	25	25	50	25
AB	-	50	25	25	-	25	25	25	12,5	12,5	12,5	25
O	-	50	-	25	50	50	50	12,5	50	50	50	6,25

- : ausencia de inhibición con 50 mmoles/L del inhibidor

Cuadro 8. Titulación del efecto inhibitorio de la galactosa, la N-acetil galactosamina y la lactosa, sobre la actividad aglutinante de la solución de lectina de *Erythrina costaricensis* con los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, Rh_o (D) negativos en diferentes pH_s.

Grupo sanguíneo	Cantidad inhibitoria de carbohidrato (milimoles)												
	Galactosa				N-acetilgalactosamina				Lactosa				
pH	6	7	8	9	6	7	8	9	6	7	8	9	
A	-	-	50	50	25	25	50	12,5	12,5	25	25	12,5	
B	-	-	50	50	25	25	25	12,5	12,5	25	25	25	
AB	25	12,5	25	25	25	25	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	
0	50	50	-	50	50	25	50	50	50	25	50	50	

- : ausencia de inhibición con 50 mmoles/L del inhibidor

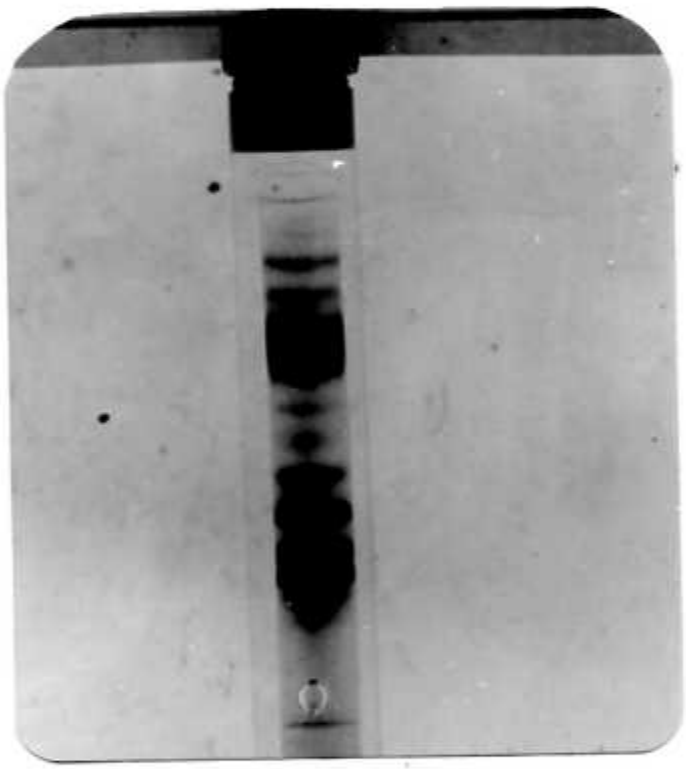


Figura 1. Electroforesis en acrilamida del extracto crudo de las semillas de *Erythrina costaricensis*.

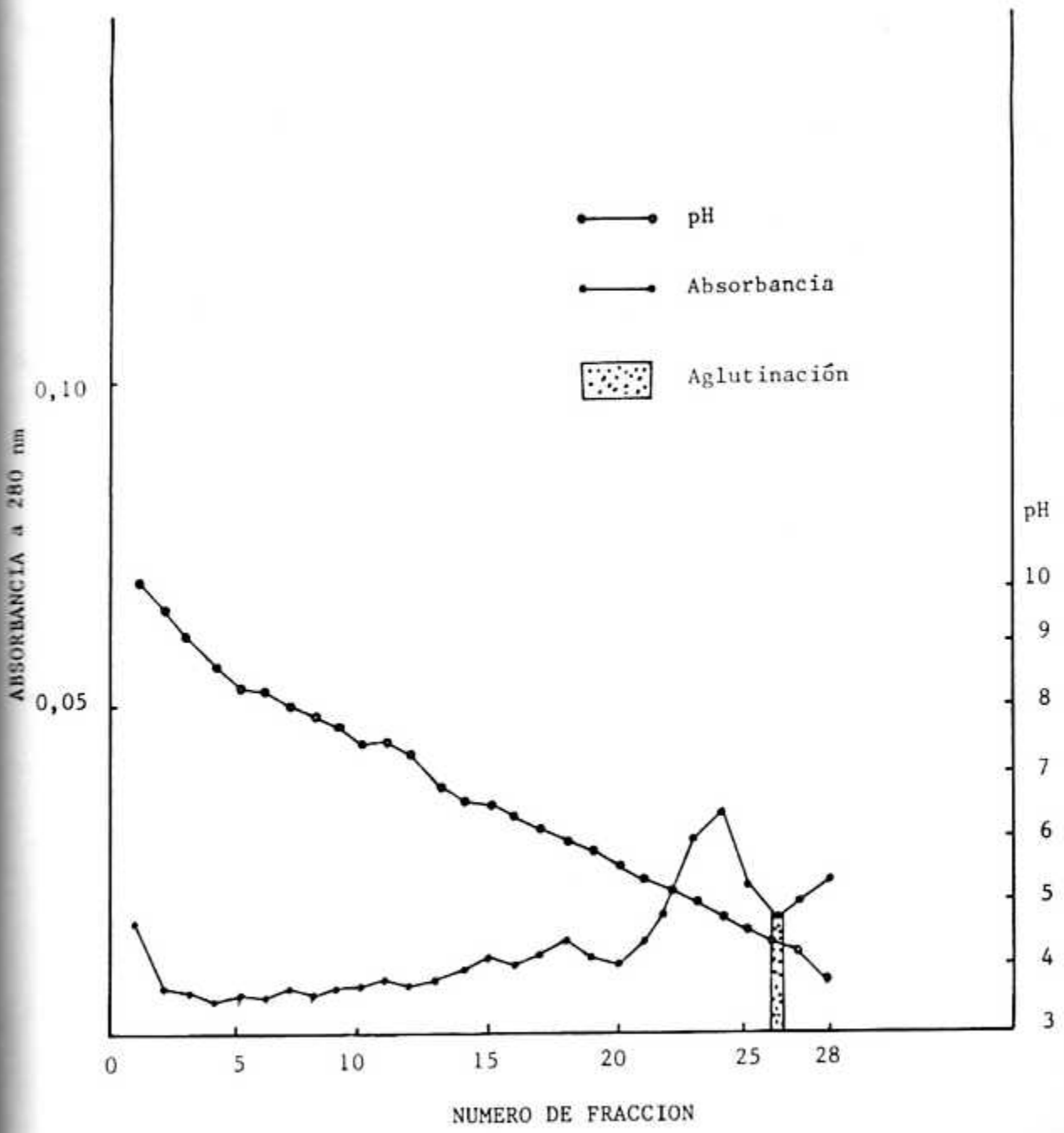


Figura 2. Isoelectroenfoque de 100 mg de liofilizado del extracto de *Erythrina costaricensis*.

Anfolito acarreador: pH 3,5 - 10 Tiempo 24 - 48 hrs.

Voltaje: 650 V Fracción de 2,5 ml.

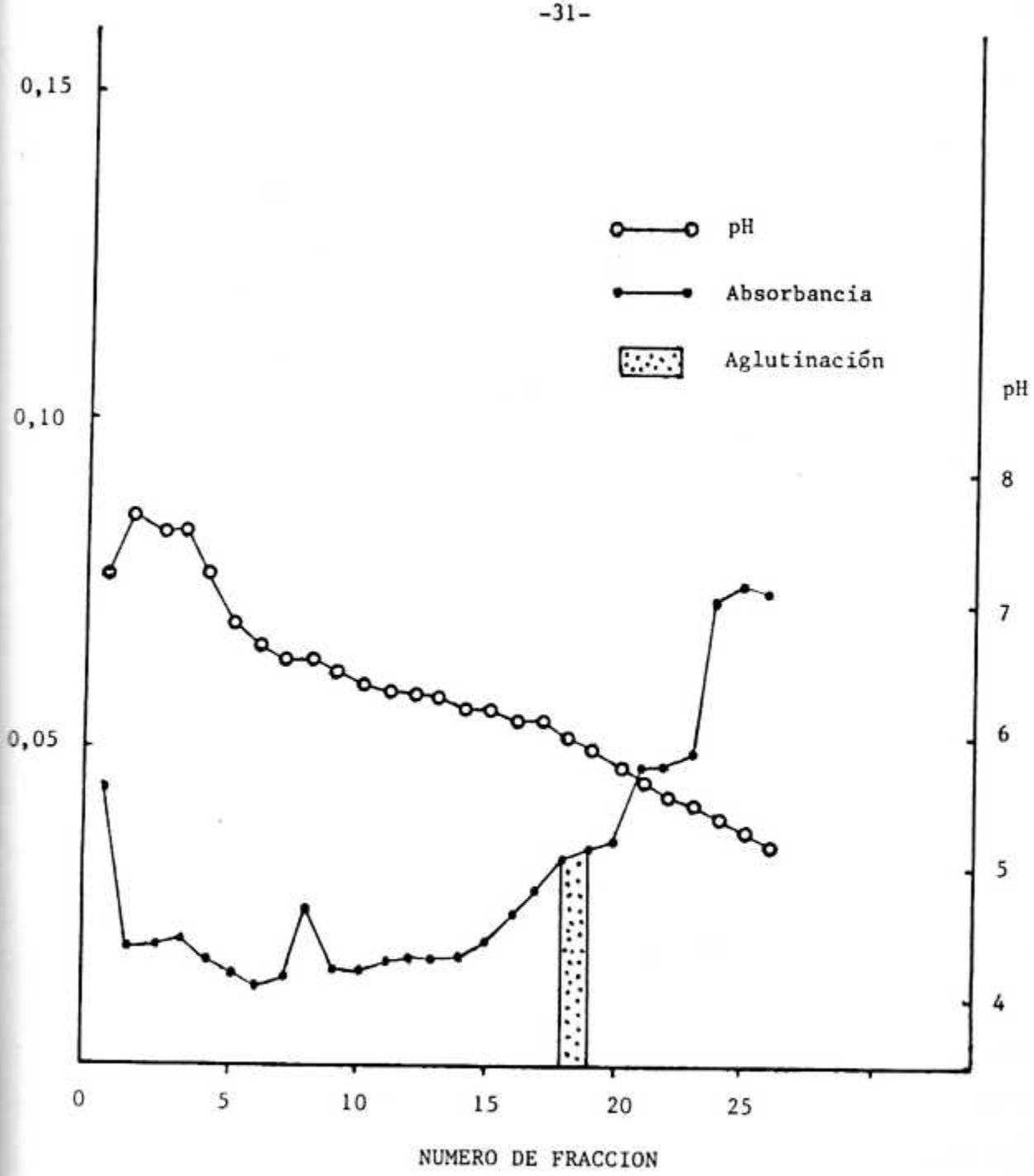


Figura 3. Isoelectroenfoque de 25 mg del liofilizado del extracto de *Erythrina costaricensis*.

Anfolito acarreador: pH 5-7 Tiempo 24 - 48 hrs.

Voltaje: 650 V Fracción de 2,5 ml.

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La actividad hemaglutinante debida a las lectinas ha sido demostrada en extractos de más de ochocientas especies de plantas, así como en caracoles y otros animales, según los trabajos de Bird (8), Toms y Western (62), y Allen y Brillantine (2).

De las lectinas aisladas sólo unas pocas han sido objeto de intensos estudios en los laboratorios. Los estudios progresivos sobre las características de estas proteínas, han permitido determinar que las lectinas, tienen un gran potencial para elucidar la estructura de polímeros que contengan carbohidratos. También es posible que se les pueda usar en la investigación de la naturaleza de la arquitectura de la superficie celular (56)

Se ha demostrado que las lectinas poseen propiedades químicas y biológicas poco usuales. En 1908, Landsteiner y Raubitschek (35), establecieron que la actividad hemaglutinante de varios extractos de semillas, eran muy diferentes cuando se probaban con glóbulos rojos de diferentes animales. Ellos compararon esta especificidad con la de los anticuerpos presentes en el suero sanguíneo del animal. Sin embargo, posteriormente a estos estudios se presumió que las fitohemaglutininas eran inespecíficas. Los estudios independiente de Renkchen (51), y Boyd y Reguеyra(12) realizados en los años cuarenta, demostraron que ciertas semillas contienen aglutininas específicas para algunos antígenos de la sangre humana,

como es el caso del extracto crudo del frijol de lima *Phaseolus limensis* que es virtualmente específico para el antígeno A, a pesar de que reacciona muy débilmente con células del tipo B. En forma similar, se encontró que los extractos de la semilla de *Vicia cracca*, contienen dos lectinas, una de las cuales reacciona en forma específica con los glóbulos rojos humanos del grupo A (54). Se han encontrado lectinas específicas para los grupos sanguíneos O, M y N. Aún no se ha encontrado una lectina para el Rh (11,55).

En el presente estudio, trabajando con el extracto crudo de *Erythrina costaricensis*, se determinó que todos los grupos sanguíneos humanos en estudio son aglutinados en forma inespecífica. Esta aglutinación inespecífica de la lectina en estudio sobre los glóbulos rojos humanos permite clasificarla como una panaglutinina. Este tipo de lectina es el más abundante en la naturaleza como lo demostraron Allen y Brillantine en 1969 (2). Estos autores trabajaron con los extractos 2663 variedades de plantas de las cuales, 711 tuvieron actividad aglutinante e inespecífica, 90 fueron específicos, 227 tuvieron acción hemolítica sobre todos los grupos sanguíneos y 1635 fueron inactivos.

Se demostró el comportamiento de la lectina de *Erythrina costaricensis* en presencia de glóbulos rojos de otros mamíferos, tales como rata, perro, carnero, caballo y conejo, observándose que no muestra actividad aglutinante sobre los glóbulos rojos de los animales mencionados, con excepción de los glóbulos de conejo, que son aglutinados muy débilmente. Esto podría

deberse a la presencia de un menor número de receptores expuestos a la lectina en la membrana del glóbulo rojo.

Nuestros resultados son semejantes a los de Iglesias, Lis y Sharon quienes en 1981 (29) trabajando con una lectina purificada de *Erythrina cristagalli*, encontraron que ésta aglutinaba los glóbulos rojos humanos de todos los grupos sanguíneos así como los de conejo. Sin embargo no todas las lectinas de *Erythrina sp.* se comportan igual. Así Pérez en 1984 (47) trabajando con una lectina aislada de las semillas de *Erythrina edulis*, encontró que aglutinaba los glóbulos rojos de bovino, conejo y sapo (*Bufo marinus*) pero no los de caballo o los de perro.

Considerando que la lectina presente en el extracto de *Erythrina costaricensis* aglutinaba a todos los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, se procedió a titular la capacidad aglutinante usando diluciones seriadas desde 1:2 hasta 1:64, con el propósito de encontrar alguna característica diferencial en la capacidad aglutinante que permitiera calificar a la lectina como específica para algunos de los grupos sanguíneos a determinada concentración. Se encontró que la lectina diluída 1:8 aglutinó todos los glóbulos rojos, pero a la dilución siguiente 1:16, ya no hubo aglutinación. El hecho de no poder separar entre los diferentes grupos sanguíneos humanos en base a diluciones, puede deberse a que el tipo y el número de los receptores de la membrana son comunes a todos estos grupos. Por lo tanto, la aglutinación en este caso, no está relacionada con los determinantes de los grupos sanguíneos. Para explicar

el fenómeno de aglutinación específica e inespecífica Sharon y Lis (56) manifiestan que esta especificidad no está relacionada necesariamente a los determinantes de los grupos sanguíneos, como es el caso de la concanavalina A, que es específica con los alfa D manopiranósidos, los alfa D glucopiranósidos y los alfa N-acetil D glucosaminídeos (alfa y beta) como lo demostraron Lis et al en 1973 (36): y la ricina hacia la D galactosa según Pardoe y Uhlenbruck en 1970 (46). Sharon y Lis concluyen que estas lectinas interactúan con los glóbulos rojos fijándose a receptores de sacáridos diferentes a los determinantes de los grupos sanguíneos y que tales receptores están presentes en la superficie de todos los glóbulos rojos (56).

Nuestros resultados permiten clasificar la lectina como una del tipo galactosafílica, en forma similar a la lectina encontrada en las semillas de *Erythrina corallodendron* (24). Esta lectina es similar a la de la soja, en que también es galactosafílica (49). Franz et al en 1981 (22) aislaron tres lectinas de un extracto de *Viscum album* (muérdago), dos de ellas afines a la galactosa y la otra a la N acetil galactosamina. Hardman et al en 1983 (28) aislaron lectinas de diversos líquenes; algunas de éstas afines a la galactosa y a la N acetil galactosamina. Este es el caso de la lectina extraída del líquen *Placynthium asperellum* y *Santhoria candelaria*. Barbieri et al en 1983 (4) trabajando con dos lectinas del látex de las plantas euforbiáceas *Hura crepitans* y *Euphorbia characias*, encontraron que su actividad hemaglutinante era inhibida por la D galactosa y por oligosacáridos con galactosa. En 1982,

Suresh, Kumar et al (32) extrajeron una lectina galactosafílica de la semilla de *Artocarpus integra*. En 1981, Bauman y Rudiger (7) extrajeron dos lectinas de la *Vicia cracca*, una de ellas con afinidad hacia la N acetilgalactosamina. Vasta et al en 1982 (64) encontraron lectinas galactosafílicas en el plasma de tunicados.

El carácter galactosafílico de la lectina explica en parte la panaglutinación de ésta sobre los glóbulos rojos humanos ya que la galactosa y sus derivados son un componente abundante de la membrana de los glóbulos rojos humanos. Una posible diferencia entre las membranas de los glóbulos rojos humanos y de animales consiste en que los carbohidratos que actúan como receptores de la lectina no estén expuestos o que estén ausentes de dicha estructura (56). Habiéndose determinado la naturaleza galactosafílica de la lectina de *Erythrina costaricensis*, se procedió a determinar si había variaciones, en cuanto al poder de aglutinación de la lectina sobre los glóbulos rojos humanos, cambiando los valores del pH. Se encontró que el pH no interfiere, con la capacidad aglutinante de la lectina, lo que hace pensar que la unión de la lectina con la membrana del glóbulo rojo no es mediado por cargas eléctricas. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Roberson y Strenght en 1983 (52), los cuales probaron una lectina aislada de un frijol de *Vigna unguiculata* a una amplia gama de valores de pH (entre 2 y 12), sin que ésta perdiera su actividad aglutinante.

Analizando la capacidad inhibitoria de la galactosa, la N acetil

galactosamina y la de la lactosa, en diferentes rangos de pH, se encontró, que si bien los tres azúcares son inhibitorios, la galactosa tiene menor capacidad de hacerlo. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Suresh Kumar, et al en 1982 (32). Estos autores, trabajando con la lectina de la semilla de *Artocarpus integra* encuentran que la N acetil galactosamina es cuatro veces mejor inhibidor que la galactosa. Nsimba Lubaki et al en 1983 (43) encontraron que la lectina aislada de las semillas de *Euphorbia heterophylla*, era inhibida más fuertemente con la N acetil galactosamina que con la galactosa. Barbieri et al en 1983 (4) trabajando con dos lectinas aisladas del látex de euforbiaceas, encontraron que entre los azúcares inhibidores, el que lo hacía más débilmente era la galactosa.

El hecho de tener dos lectinas presentes en el extracto crudo de *Erythrina costaricensis* no invalida el desarrollo de esta investigación, pues ambas tienen la misma especificidad hacia la galactosa y podrían ser arreglos cuaternarios diferentes de una misma lectina como ha sido descrito para la concanavalina A (56).

Se concluye que a pesar del gran esfuerzo que se ha hecho en el progreso del estudio de las lectinas, aún se desconocen muchas de sus propiedades, usos y funciones. Uno de los problemas principales que se ha encontrado en su estudio, es que por su naturaleza protéica, son muy difíciles de obtener en forma pura. Además esto se complica pues su caracterización depende del uso de células intactas.

El trabajo con la lectinas de *Erythrina costaricensis*, no se ha agotado, sólo se ha realizado con ellas el trabajo básico, que podría considerarse clásico. Ahora se hace necesario continuar con fases más avanzadas que permitan adquirir un conocimiento más exacto sobre estos compuestos.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Alexander, S., Cibulsky, A.M. and Lerner, R.A. 1983. Ion dependence of the discoidin I lectin from *Dictyostelium discoideum*. Differentiation. 24:209-212.

2. Allen, N.K. and Brillantine, L. 1969. A survey of hemagglutinis in various seeds. J. Inmunol. 102:1295-1299.

3. Allen, A.K. and Neuberger, A. 1973. The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hidroxiproline-containing glycoprotein. Biochem, J. 135:307-314.

4. Barbieri, L., Falasca, A. Franceschi, C. and Licastro, F. 1983. Purification and properties of two lectins from the latex of the euphorbiaceous plants *Hura crepitans* L. (sand box tree) and *Euphorbia characias L.* (mediterranean spurge) Biochem J. 215:433-439.

5. Barondes, S.H. 1981. Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. Ann. Rev. Biochem 50: 207-231.

6. Bauman, C.M. and Rudiger, H. 1981. Interactions between the two lectins from *Vicia cracca*. FEBS Lett. 136: 279-283.

7. Bauman, C.M., Strosberg, D. and Rüdiger, H. 1982. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Vicia cracca*. Eur. J. Buochem. 122: 105-110.

8. Bird, G.W.G. 1959. Citado por Sharon, N., and Lis, H. 1972. Lectins: Cell agglutinanting and sugar specific proteins. Science 177:949-959.

9. Bishayee, S. and Dorai, D.T. 1980. Isolation and characterization of a sialic acid-binding lectin (carcinoscorpia) from indian horseshoe crab *Carcinoscorpius rotunda cauda*. Biochim Biophys. Acta. 623: 89-97.

10. Borrebacck, C.A.K., Lonnerdal, C. and Etzler, M.E. 1981. Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. Biochemistry. 20:4119-4122.

11. Boyd, W.C. 1963. Citado por Brown, J.C. and Hunt, R. 1978. Lectins. Int. Rev. Cytol. 53: 277-349.

12. Boyd, W.C. and Regueyra, R.M. 1949. Citado por Rüdiger, H. 1977. Purification and properties of blood group specific lectins from *Vicia cracca*. Eur. J. Biochem. 72: 317-322.

13. Boyd, W.C., and Shapleigh, E.E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science. 119:419.

14. Brown, J.C. 1978. Lectins. Int. Rev. Cytol. 52:277-349.

15. Cuatrecasas, P. and Tell, G.P.E. 1973. Insulin-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin-direct interactions with insulin receptors. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70:485-489.

16. Cumsky, M. and Zusman, D.R. 1979. Myxobacterial hemagglutinin: A development specific lectin of *Myxococcus xanthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:5506-5509.

17. Desai, N.N., Allen, A.K. and Neuberger, A. 1983. The properties of potato *Solanum tuberosum* lectin after deglycosylation by trifluoromethanesulphonic acid. Biochem. J. 211: 273-276.

18. Dugüid, J.P., Glegg, S. and Wilson, M.I. 1979. The fimbrial and nonfimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. J. Med. Microbiol. 12: 213-227.

19. Erlich, P. 1890. Citado por: Sharon, N., Lis, H. 1972. Lectins: Cell agglutinating and sugar specific proteins Science. 177: 949-959.

20. Franklin, U. 1983. Tissue binding of lectins in disorders of the breast. Cancer 51:295-300.

21. Franklin, G.I., Walsh, F.S. and Thompson, E.J. 1980. Endogenous lectins of human muscle. FEBS. Lett. 118: 220-204.

22. Franz, H., Ziska, P. and Kindt, A. 1981. Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album L.*). Biochem. J. 195: 481-484.

23. Gartner, T.K., Stocker, K. and Williams, D.C. 1980. Thrombolectin. A. lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. FEBS. Lett. 117: 13-16.

24. Gilboa Garber, N. and Mizrahi, L. 1981. A new mitogenic D-galactosaphilic lectin isolated from seeds of the coral tree *Erythrina corallodendron*. Comparison with *Glycine max* (soybean) and *Pseudomonas aeruginosa* lectins. Can. J. Biochem. 59:315-320.

25. Gold, E.R. and Balding, P. 1975. Citado por: Kimura, A.K. 1982. The fine specificity of lectins applied to the study of lymphocyte membrane structure and inmunological reactivity. EOS II: 117-124.

26. Gõmez L, M.A. 1979. Carbohydrate-induced inhibition of the red blood cell agglutination by the *Lachesis muta* snake venom. Presentado en: Eleventh International Concress of Biochemistry. Toronto, Canadá.

27. Gõmez, L. M.A. y Aragõn O.F. 1984. Purification and some properties of the hemagglutinating protein (mutina) from *Lachesis muta* venom. Presentado en: First American Symposium on Animal Plant and Microbial Toxins. Oklahoma State University.

28. Hardman, J.T., Hale, M.E., Hardman, P.K. and Beck, M.L. 1983. Report on activity of lichen lectins. Lichenologist. 15: 303-308.

29. Iglesias, J.L., Lis, H. and Sharon, N. 1982. Purification and properties of a D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Erythrina cristagalli*. Eur. J. Biochem. 247-252.

30. Katzen, H.M., Vicario, P.P., Mumford, R.A. and Grun, G.B. 1981. Evidence that the insulin-like activities of concanavalin A and insulin are mediated by a common insulin receptor linked effector system. Biochemistry. 20: 5800-5809.

31. Kocourek, J. and Horejsí, V. 1980. Defining a lectin. Nature 290: 188.

32. Kumar, G.S., Appukuttan, P.S. and Basu, D. 1982. D-galactose specific lectin from jack fruit (*Artocarpus integra*) seed: J. Biosci. 4: 257-261.

33. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T_4. Nature 227: 680-685.

34. Landsteiner, K. 1947. Citado por: Nicolson, G. 1974. The interactions of lectins with animal surfaces. Int. Rev. Cytol 39: 89-190.

35. Landsteiner, K., and Rubitschek, H. 1908. Citado por Sharon, N., and Lis, H. 1972. Lectins: Gel agglutinating and sugar specific proteins. Science 177;949-959.

36. Lis, H. and Sharon, N. 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins) Ann. Rev. Biochem. 42:541-574.

37. Lonnerdal, V., Borrebaeck, C.A.K., Etzler, M.E. and Ersson, B. 1983. Dependence on cations for the binding activity of lectins as determined by affinity electrophoresis. Biochem. Biopys. Res. Comm. 115: 1069-1074.

38. Marchalonis, J.H., and Edelman, G.M. 1968. Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. J. Mol. Biol. 32: 453-465.

39. Miller, J.B., Hsu, R., Heinrikson, R. and Yachnin, S. 1975. Extensive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1388-1391.

40. Monge, A. 1958. Contribución al estudio de las hemaglutininas vegetales (lectinas). Tesis de licenciatura. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica 1-62 p.p.

41. Nicolson, G. 1974. The interactions of lectins with animal cell surfaces. Int. Rev. Cytol 39: 89-190.

42. Nsimba-Lubaki, Q.M. and Peumans, W.J. 1983. A lectin form *Euphorbia heterophylla* seeds. Arch. Int. Phy. Biochem 91: 865-866.

43. Nsimba-Lubaki, M., Peumans, W.J. and Carlier, A.R. 1983. Isolation and partial characterization of a lectin from *Euphorbia heterophylla* seeds. Biochem. J. 215: 141-145.

44. Núñez, M.E. 1978. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore. Editorial Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 318 p.p.

45. Oser, B. 1965. Hawk's physiologycal chemistry. Mc Graw Hill. 1319 p.p.

46. Pardoe, G.I. and Uhlembruck, G. 1970. Citado por Brown, J.C., y Hunt, R. 1978. Lectins, Int. Rev. Cytol 52: 277-349.

47. Pérez, G. 1984. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina edulis*. Phytochemistry 23: 1229-1232.

48. Phillips, J.R. and Zalik, S.E. 1982. Differential lectin-mediated agglutinabilities of the embryonc and first extraembryonic cell line of the early chick embryo. Roux's Arch. Devel. Biol. 191: 234-240.

49. Pueppke, S.G., Benny, U.K. and Hymowitz, T. 1982. Soybean lectin from seeds of the wild soybean, *Glycine soja*. *Sieb y Succ* Plant Sci. Lett. 26: 191-197.

50. Reano, A., Faure, M., Jacques, Y., Reichert, U., Schaefer, H. and Trivolet, J. 1982. Lectins as markers of human epidermal cell. Differentiation 22: 205-210.

51. Renkonen, K.O. 1948. Citado por: Sharon, N., and Lis, H. 1972. Lectins: Cell agglutinating and sugar specific proteins. Science 177: 949-959.

52. Roberson, B.J., Strength, D.R., 1983. Characterization of a lectin from cowpeas. Prep. Biochem. 13: 45-56.

53. Rougé, P. and Chabert, P. 1983. Purification and properties of a lectin from *Lathyrus tingitanus* seeds. FEBS 157: 257-260.

54. RUdiger, H. 1977. Purification and properties of blood group specific lectins from *Vicia cracca*. Eur. J. Biochem.. 72:317-322.

55. Saint-Paul, M. 1961. Citado por: Browm, J.C. y Hunt, R. 1978. Lectins. Int. Rev. Cytol. 52: 277-349.

56. Sharon, N., Lis, H. 1972. Lectins: Cell agglutinating and sugar specific proteins. Science 177: 949-959.

57. Shimizu, S., Ito, M., and Niwa, M. 1977. Lectins in the hemolymph of japanese horseshoe crab, *Tachypleus tridentatus*. Biochim Biophys. Acta. 500: 71-79.

58. Stewart-Tull, D.E.S. and Arbuthnott, J.P. 1971. The separation of guinea pig serum proteins by a preparative isoelectric focusing method. The LKB Instrumental Journal 18: 17-21.

59. Stillmark, H. 1888. Citado por: Sharon, N., Lis, H. 1972. Lectins Cell agglutinating and sugar specific proteins. Science 177: 949-959.

60. Summer, J.B. and Howell, S.F. 1936. Citado por: Nicolson, G. 1974. The interations of lectins with animal surfaces. Int. Rev. Cytol. 39:89-190.

61. Tollefsen, S.E. and Kornfeld, R. 1983. Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa*. J. Biol. Chem. 258: 5165-5171.

62. Toms, G.C., and Western, A. Citado por: Sharon, N. and Lis, H. Lectins: Cell agglutinating and sugar specific proteins. Science. 177: 949-959.

63. Uhlenbruck, G., Janssen, E. and Javeri, S. 1982. Two different antigalactan lectins in eel serum. Inmunobiol. 163: 36-47.

64. Vasta, G.R., Wair, G.W. and Marchalonis, J.J. 1982. Tunicate lectins: distribution and specificity. Comp. Biochem Physiol. 73B: 887-800.