

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
Sistema de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO, PURIFICACION Y
CARACTERIZACION DE UNA LECTINA DE
LA SEMILLA DEL PORO
(Erythrina costaricensis)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios
de Posgrado en Ciencias Biomédicas para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

CLARA ISABEL NANNE ECHANDI

Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio", Costa Rica

1988

DEDICATORIA

A mis Padres.

A Rodrigo.

AGRADECIMIENTO

Quiero hacer patente mi profundo agradecimiento a todas aquellas personas que en forma generosa y desinteresada contribuyeron a que el presente trabajo de investigación llegara a feliz término. En forma particular deseo destacar la gran ayuda que me brindó el Dr. Federico Aragón Ortiz, tutor, guía y consejero, trabajador infatigable y crítico con profundos conocimientos en la materia.

Al Dr. Jorge Rodríguez Barquero, quien me inició en los procesos analíticos de los que él es un consumado maestro.

Al Dr. Pedro León Azofeifa del Centro de Biología Celular y Molecular por sus valiosos consejos y haber puesto a mi disposición equipo y asistencia técnica para la determinación del peso molecular por electroforesis y del punto isoeléctrico.

Finalmente y no por ello menos importante quiero hacer mi extensivo agradecimiento a la Dra. Ana Sittenfeld Appel, al Dr. Edgardo Moreno Robles, a los asistentes Manuel Sánchez Chacón y Sergio Lizano González, todos ellos del Centro de Biología Celular y Molecular y a mis queridos compañeros del Departamento de Bioquímica, José Miguel Jiménez Ortega, Alfredo Arce Gutiérrez y Ethel Sánchez Chacón.

Esta tesis fue aprobada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica como requisito parcial para optar al Grado de Magister Scientiae.



Dr. Luis Estrada Navas

Decano del Sistema de Estudios de Posgrado.



M.Sc. Mercedes Barquero García

Representante del Director del Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas.



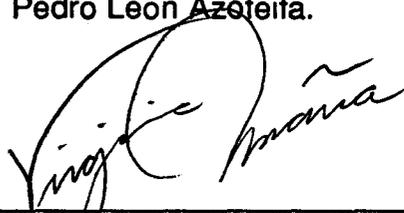
Dr. Federico Aragón Ortiz

Director de Tesis



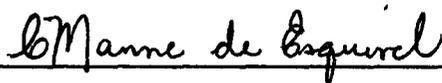
Dr. Pedro León Azofeifa.

Miembro del Tribunal



Dra. Virginia Umaña Umaña

Miembro del Tribunal



Clara Isabel Nanne Echandi.

Candidata.

INDICE	PAGINA
	vi
RESUMEN	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCION	9
2. MATERIALES Y METODOS	9
2.1. PURIFICACION DE LA LECTINA	9
2.1.1. Filtración por gel	9
2.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	9
2.1.3. Afinidad cromatográfica	10
2.2. METODOS PARA DETERMINAR EL GRADO DE PUREZA	11
2.2.1. Electroforesis en gel de acrilamida	11
2.2.2. Determinación del punto isoeléctrico	11
a. Electroenfoque preparativo	11
b. Electroenfoque analítico	12
2.2.3. Determinación del peso molecular	12
a. Por filtración por gel	13
b. Por electroforesis en gel de acrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio.	13
2.3. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	14
2.3.1. Determinación de hexosas en la molécula de <i>Erythrina costaricensis</i>	14
2.3.2. Determinación de ácido siálico	14
2.3.3. Titulación del poder aglutinante con diferentes eritrocitos.	15
2.3.4. Efecto de iones diferentes sobre la aglutinación	15
2.3.5. Estabilidad de la lectina a la temperatura	16
2.3.6. Estabilidad de la lectina al pH.	16
2.3.7. Actividad fisiológica	16
2.3.8. Determinación del espectro de absorción ultravioleta	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSION	40
5. CONCLUSIONES	46
6. LITERATURA CITADA	47

RESUMEN

A partir del extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis* se purificó la lectina utilizando tres tipos de cromatografía; filtración por gel con Sephadex G-100, intercambio iónico con DEAE - Sephadex A-50 y afinidad con galactosa acoplada covalentemente a sefarosa.

Por medio de la electroforesis en gel de acrilamida se demostró la presencia de una sola banda protéica. El peso molecular obtenido por filtración en Sephadex G-100 fué de 58 KDa y por gel de acrilamida en presencia de S.D.S. de 29,51 KDa.

La lectina se puede considerar fundamentalmente como un dímero formado por dos subunidades de aproximadamente el mismo peso molecular, no enlazadas por puentes disulfuro. Utilizando el isoelectroenfoco analítico se pudo demostrar la presencia de no más de cuatro isolectinas con puntos isoelectrónicos de 5,70, 5,90, 6,13 y 6,50.

La lectina es una glicoproteína con 6,50 por ciento de azúcares neutros en su molécula exenta de ácido siálico. Su acción aglutinante se demostró con eritrocitos de conejo y pollo. No se encontró actividad aglutinante con los eritrocitos de caballo, cabra, carnero y rata.

Los iones calcio y manganeso son potenciadores de la actividad hemaglutinante mientras que el E.D.T.A. ejerce un efecto inhibitor.

La lectina es estable hasta 70 C y en ámbito de pH de 2 a 10.

No se encontró efecto vasopresor al inyectar la lectina intravenosamente en ratas Sprague-Dowley.

LISTA DE CUADROS

		PAGINA
CUADRO 1.	Titulación del poder de aglutinación de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i> sobre los eritrocitos de caballo, cabra, carnero, conejo, pollo y rata al 6 por ciento en solución salina.	34
CUADRO 2.	Titulación del poder de aglutinación de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i> sobre el grupo sanguíneo humano O, Rho (D) positivo en presencia de CaCl ₂ , MgCl ₂ y EDTA, 0,10M en solución tampón de 0,10M TRIS + NaCl, pH 7,40.	35

LISTA DE FIGURAS

			PAGINA
FIGURA	1	Filtración por gel del extracto crudo de la semilla de <i>Erythrina costaricensis</i>	21
FIGURA	2	Repurificación por filtración en gel en Sephadex G- 100 del material con actividad hemaglutinante (Fig 1. tubos 59-73)	22
FIGURA	3	Cromatografía por intercambio iónico en DEAE-Sephadex A- 50 de la fracción de lectina repurificada por filtración por gel.	23
FIGURA	4	Cromatografía de afinidad de la lectina purificada por intercambio iónico.	24
FIGURA	5	Isoelectroenfoque preparativo de la fracción hemaglutinante obtenida por filtración por gel. (Fig 1. tubos 59-73)	25
FIGURA	6	Electroforesis en gel de acrilamida, pH 8,40 a) extracto crudo b) lectina purificada por afinidad cromatográfica de la semilla de <i>Erythrina costaricensis</i> .	26
FIGURA	7	Electroforesis en gel de acrilamida (pH 8,40) de lectina purificada por afinidad cromatográfica Gel teñido por: a) Azul de Coomasie b) P.A.S.S. (Acido peryódico- Schiff).	27
FIGURA	8	Determinación del peso molecular de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i> por filtración por gel	28
FIGURA	9	Determinación del peso molecular de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i> por electroforesis en gel de acrilamida	29
FIGURA	10	Electroforesis en gel de acrilamida de la lectina pura en presencia de a) B - mercaptoetanol, b) E.D.T.A, c) S.D.S.	30
FIGURA	11	Determinación del punto isoeléctrico por isoelectroenfoque analítico.	31

FIGURA	12	Isoelectroenfoco analítico de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i>	32
FIGURA	13	Curva estándar para la determinación de hexosas por el método de Winzler.	33
FIGURA	14	Efecto de la temperatura sobre la actividad hemaglutinante de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i>	36
FIGURA	15	Efecto del pH sobre la actividad hemaglutinante de lectina de <i>Erythrina costaricensis</i> .	37
FIGURA	16	Registro de presión arterial (P.A.) antes y después de la infusión intravenosa, vía yugular izquierda de 0,50 mL (1,06 mg) de la lectina de la semilla de <i>Erythrina costaricensis</i> a una rata no anestesiada.	38
FIGURA	17	Espectro de absorción de la lectina de <i>Erythrina costaricensis</i> .	39

LISTA DE ABREVIATURAS

SDS	duodecil sulfato de sodio
DEAE	dietilaminoetil
PASS	ácido peryódico-Schiff
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
TRIS	hidroximetilaminometano

1. INTRODUCCION

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

Desde el punto de vista bioquímico las lectinas son proteínas simples o glicoproteínas formadas por más de una subunidad proteica con capacidad para enlazar carbohidratos; están desprovistas de actividad enzimática hacia los azúcares a los que se unen y no requieren de grupos hidroxilo libres para efectuar dicha acción (Kocourek y Horejsí 1980).

Desde hace algunos años se ha estudiado sistemáticamente, al género *Erythrina* como fuente de lectinas. Este género pertenece a la familia Leguminosae, tribu Erythrineae, subtribu Phaseolae. Los árboles y arbustos que constituyen este género se encuentran ampliamente distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales (Gunn y Barnes 1977). Se han descrito 108 especies, las cuales son muy diferentes a los otros géneros que forman la familia Leguminosae. En Costa Rica, se han descrito en el Valle Central intermontano 6 especies que son: *Erythrina berteriana* Urban, *E. costaricensis* Micheli, *E. cristagalli* Linnaeus, *E. fusca* Loureiro, *E. lanceola* Standley y *E. poeppigiana* (Walpens) O.F Cook. Esta se ha utilizado como árboles de sombra en las plantaciones de café y también con fines ornamentales en reservas, parques y jardines (Flores y Rivera 1984).

Desde hace muchos años, diferentes autores han encontrado actividad hemaglutinante en los extractos de semillas de diferentes especies de *Erythrina*. Monge (1958) en Costa Rica encontró actividad hemaglutinante con un extracto de semillas de *Erythrina berteriana*. Seguido Horejsi et al. (1980), Bhattacharyya et al. (1981) Gilboa-Garber y Mizhari (1981) Datta y Basu (1981) y Iglesias et al. (1982) aislaron, purificaron y estudiaron lectinas obtenidas de las semillas de *E. indica*, *E. cristagalli*, *E. arborescens*, *E. suberosa*, *E. lithosperma*, *E. corallodendron*, *E. variegata* (Linn) var. *orientalis* (Linn. Merrill). Nanne (1984) encontró actividad hemaglutinante en un extracto de semillas de *E. costaricensis*.

Todas las lectinas aisladas de las especies de *Erythrina* son galactosafílicas y aglutinan en forma inespecífica los eritrocitos humanos.

Pérez (1984) aisló una lectina de la semilla de *E. edulis*, la cual comparó en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas con las lectinas de otras especies de *Erythrina*. Él encontró que las lectinas de las diferentes *Erythrinas* estudiadas son similares en muchas de sus propiedades fisicoquímicas y concluyó que probablemente cumplen una misma función aún no establecida.

Lis et al.(1985) compararon las propiedades fisicoquímicas de las lectinas aisladas de 9 especies de *Erythrina* (*E. caffra*, *E. corallodendron*, *E. flabelliformis*, *E. latissinia*, *E. lysistemom*, *E. humeana*, *E. perrieri*, *E. stricta* y *E. zeyheri*) con la lectina aislada de *E. cristagalli*, encontrándose una gran similitud estructural y funcional con ésta. Bhattacharyya et al.(1986) realizaron un estudio similar comparando las lectinas aisladas de las semillas de 4 especies de *Erythrina* (*E. indica*, *E. arborescens*, *E. suberosa* y *E. lithosperma*) encontrando muchas similitudes entre ellas.

El mayor número de lectinas estudiado ha sido aislado de los vegetales y en éstos, se encuentran principalmente en las semillas, aunque también están presentes en otros tejidos de las plantas. Son especialmente abundantes en las gramíneas y en las leguminosas (Lis y Sharon 1986).

Allen y Brillantine (1969) trabajaron con 2663 extractos de diferentes plantas y semillas, encontrando 801 extractos con actividad aglutinante para los eritrocitos humanos.

Etzler y Kabat (1970) encontraron una lectina en la semilla de *Dolichos biflorus* específica para el grupo sanguíneo humano A.

Matsumoto y Osawa en (1969) separaron dos lectinas de la semilla de *Ulex europeus* con actividad aglutinante del grupo sanguíneo humano O.

Los estudios de Iyer et al.(1976), Brossmer et al. (1975) y Young et al.(1984) demostraron en extractos de diferentes semillas, lectinas

múltiples con especificidad hacia la N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y D-galactosa.

Stinessen et al.(1983), Shen et al. (1984) investigaron la presencia de lectinas en más de 100 especies de gramíneas, encontrándose que todas las especies pertenecientes a la tribu Triticeae y a los géneros *Brachypodium* y *Oryza* exhiben actividad hemaglutinante.

Las funciones exactas que desempeñan las lectinas en los vegetales, animales y microorganismos no han sido determinadas con exactitud. Se han elaborado hipótesis que requieren de mucha investigación con el propósito de que queden plenamente demostradas. Los ejemplos que a continuación se describen ilustran en alguna medida lo anterior.

Se ha encontrado que la lectina de la papa (*Solanum tuberosum* c.v Huinkul) es una glicoproteína extracelular asociada a la pared celular. Se ha sugerido que esta lectina cumple un papel fisiológico vinculado a las interacciones de célula a célula.(Casalengué y Pont Lezica 1985).

Elad et al.(1983) encontraron que las lectinas juegan un papel en ciertas micoparasitosis, como es el caso de la *Rhizoctomia solani* y *Trichoderma harzianum*. Ellos encontraron una lectina presente en las hifas de *R. solani* que se fija a un carbohidrato presente en la pared de *T. harzianum*.

En 1978, se encontró que la aglutinina del germen de trigo y otras lectinas de plantas se unian especialmente a las puntas de las hifas y septos de *Trichoderma viride*, así como a hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus*, inhibiendo el crecimiento de los hongos, así como la germinación de esporas. Se sugirió que las lectinas protegen a las plantas de los hongos que contienen quitina y glucanos en sus paredes. (Mirelman et al. 1975), (Barkai-Golan et al. 1978).

A través de los diferentes experimentos se ha supuesto por evidencia indirecta que las lectinas de los cereales u otras similares cumplen funciones específicas. Se ha podido determinar que las lectinas que se encuentran en la familia Gramineae son importantes para que la

planta cumpla un desarrollo normal en los diferentes estadios de su ciclo vital. Un ejemplo de lo anterior es aquel en que las lectinas constituyen un sistema o parte de este, que mantiene los ejes embrionicos en desarrollo, en un estado de reposo. Estas lectinas se sintetizan exclusivamente en los ejes primarios en desarrollo y se comportan como proteínas específicas en el periodo de inactividad (Peumanns y Stinissen 1983).

Numerosos investigadores han relacionado las lectinas en la interacción de algunas bacterias fijadoras de nitrógeno con ciertas plantas leguminosas. Se ha postulado que existe selectividad en la unión de la bacteria con la planta, hecho que constituye un prerrequisito para la fijación de nitrógeno, este fenómeno parece ser mediado por lectinas en la planta (Simpson 1978).

Ofek et al. (1977) demostraron que la *Escherichia coli*, en el proceso de fijación a la mucosa intestinal humana, lo hace a través de un complejo molecular tipo lectina, manosa específica, presente en la superficie bacteriana en las fimbrias o pili.

Peters et al. (1983) describieron por primera vez, una lectina localizada por medio de microscopia electrónica, utilizando partículas de oro coloidal marcadas con peroxidasa en la membrana peritrófica de la mosca *Calliphora erythrocephala*. Estos autores demostraron que esta lectina tiene una alta especificidad para la mucosa. En el lumen de la membrana peritrófica de la larva hay residuos de manosa y glucosa; la membrana está densamente poblada con dos especies de bacterias *Proteus vulgaris* y *Proteus morgani*. Estas bacterias tienen lectinas manosa en sus fimbrias. Estos hallazgos permiten asumir que los receptores manosa específicas y residuos de manosa en la membrana peritrófica y en las bacterias, actúan en la adherencia mutua entre las bacterias y la membrana peritrófica.

Komano y Natori (1985) encontraron que en las larvas de *Sarcophaga peregrina* podía inducirse la producción de lectinas en la hemolinfa, cuando se lesionaba la pared corporal con una aguja

hipodérmica. Se demostró que esta lectina participaba en la lisis de eritrocitos de carnero introducidos en la cavidad abdominal de la larva. Estos hallazgos indicaron que esta lectina humoral desempeña un papel en los mecanismos de defensa de los invertebrados. La lisis de los eritrocitos de carnero aumentaba grandemente con la preinyección de eritrocitos, pero la reacción era mucho menor si había preinyección con otras células. Los autores concluyeron que los mecanismos de defensa de este insecto parecieran ser capaces de distinguir eritrocitos de otras células.

Whitney *et al.* (1985) postularon que las lectinas presentes en las células pulmonares de los mamíferos intervienen en las interacciones de célula a célula. Estos autores encontraron que la unión de la lectina B galactósido-específica de rata a eritrocitos, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos es a través de mecanismos básicamente iguales.

Las interacciones de la lectina-carbohidrato juegan un papel importante en la actividad de las células fagocíticas, en el proceso de fijación e ingestión de las bacterias, papel que también ha sido demostrado con los eritrocitos tratados con sialidasa, con levaduras, así como la destrucción de células tumorales. Los procesos anteriores han sido estudiados *in vitro*, pero debe existir una relación relevante en la función de las células fagocíticas *in vivo*. Por ejemplo, las interacciones lectina-carbohidrato, pueden proveer un mecanismo de defensa del huésped, después de la infección primaria con bacterias y antes de que se establezca la respuesta inmune. También pueden funcionar en tejidos donde la actividad normal de las opsoninas es pobre. Este autor sugiere que las lectinas intervienen en el proceso de destrucción de los eritrocitos seniles del sistema circulatorio. El hallazgo de que las lectinas extracelulares aumentan en forma marcada la fagocitosis de microorganismos, abre la posibilidad de que dichas lectinas puedan ser usadas para el tratamiento de heridas infectadas. La habilidad de los macrófagos de unirse a lectinas y carbohidratos en forma específica

puede ser utilizado para enviar agentes farmacológicos y genes a dichas células con lo que podría corregirse algunos trastornos genéticos y procesos malignos.(Sharon 1984), (Ofek y Sharon 1988).

Otra función importante que ha sido descubierta recientemente está definida por los trabajos de Ashwell y Morell (1974), Ashwell y Hartford (1982), quienes encontraron en la membrana plasmática de los hepatocitos de conejo, un receptor galactosa específico. Este receptor es una lectina de membrana que ha sido estudiada y a la que se le atribuye la función de remover asialoglicoproteínas de la circulación sanguínea. Perry *et al.*(1985) concluyeron que las lectinas presentes en las células de Kupfer del hígado y otras células fagocíticas participan en la eliminación de bacterias invasoras actuando en el proceso de fagocitosis sin que sea necesaria la participación de opsoninas.

Desde su descubrimiento y hasta fecha muy reciente las lectinas aisladas de diferentes plantas tuvieron usos muy limitados, siendo los más importantes la clasificación de la sangre en grupos y la inducción mitogénica de linfocitos. Recientemente se les está utilizando como reactivos para el estudio de carbohidratos simples y complejos en solución o formando parte de la membrana celular. También se les ha utilizado para la identificación, separación y selección de células mutantes resistentes a las lectinas de células animales, con patrones glicoprotéicos alterados (Lis y Sharon 1986).

Otras investigaciones han permitido determinar que un buen número de las lectinas que se han aislado son mitogénicas. Sin embargo recientemente se han encontrado lectinas antimitogénicas, tal es el caso de la lectina de la fruta del tomate (*Lycopersicon esculentum*), que cumple esta función al ponerse en contacto con cultivos de linfocitos humanos, produciéndose la supresión de la síntesis espontánea del ADN. Estos hallazgos permiten suponer que la actividad antimitogénica *in vitro* puede tener un efecto inmunosupresor *in vivo*, con lo cual estas lectinas podrían utilizarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunes o

bien para evitar el rechazo inmunológico después de un transplante de órganos o tejidos. (Kilpatrick *et al.* 1986).

En los últimos años se ha logrado utilizar a las lectinas como herramientas muy importantes para el estudio histoquímico de una gran variedad de tejidos normales y también neoplásicos. Yen *et al.* (1986) demostraron que ciertas lectinas pueden distinguir histoquímicamente las glándulas del endocérvix de las del endometrio. Se ha podido determinar la presencia de receptores para lectina en algunas neoplasias, como es el caso del cáncer de la mama (Calafat y Janssen 1984), del cérvix (Bychkov y Toto 1986), de las glándulas salivales (Toida *et al.* 1985) y de la piel (Matalanis *et al.* 1986).

Kumar *et al.* (1986) reportaron el uso de lectinas para el diagnóstico diferencial de tumores renales en niños.

Las lectinas también se han utilizado para la diferenciación y caracterización de distintos tipos de protozoarios parásitos. Schottelius y Da Costa (1982) establecieron patrones de aglutinación utilizando diferentes lectinas entre cultivos de *Leishmania mexicana pifanoi*, *L. mexicana mexicana*, *L. braziliensis braziliensis* y *L. mexicana amazonensis*.

Miranda Santos y Pereira (1984) encontraron carbohidratos de superficie en *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* y *T. conorhini* que fueron analizados por técnicas de microaglutinación utilizando 27 lectinas altamente purificadas. Estos investigadores demostraron que las lectinas pueden discriminar entre Tripanosomas suramericanos patógenos de los no patógenos.

Desde el año de 1983 se inició en forma sistemática el estudio preliminar de lectinas del género *Erythrina* en Costa Rica. Fue así como se logró determinar la presencia de lectinas en las semillas de *E. costaricensis*, *E. poeppigiana* y *E. globocaliz*. En el caso de la lectina de *E. costaricensis*, se logró determinar su comportamiento como aglutinante inespecífico de los eritrocitos humanos y se encontró que la galactosa, N

acetilcalactosamina y la lactosa actúan como inhibidores de la actividad hemaglutinante (Nanne 1984).

El presente trabajo ha tenido como objetivos el aislamiento, la purificación y la caracterización de la lectina de la semilla de *E. costaricensis* a efecto de poder determinar posteriormente sus aplicaciones en los campos de la medicina, parasitología y oncología.

2. MATERIALES Y METODOS

La preparación de los extractos de las semillas de *Erythrina costaricensis* se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Nanne 1984.

2.1 PURIFICACION DE LA LECTINA

2.1.1 - Filtracion por gel

Se disolvieron 100 mg del extracto crudo liofilizado en 7 mL de solución tampón (0,10M TRIS + NaCl, pH 7,40). Se centrifugó y luego se aplicó a una columna (2,50 X 100 cm.) empacada con Sephadex G-100, equilibrada con la misma solución tampón. Se aplicó un flujo de 25 mL por hora y se recogieron fracciones de 2,50 mL en un colector de fracciones LKB. A cada fracción se le determinó la densidad óptica a 280 nm y se le midió la actividad hemaglutinante. Las fracciones hemaglutinantes obtenidas se aplicaron de nuevo a la misma columna repitiéndose el procedimiento anterior con el objeto de lograr una mayor purificación.

2.1.2 - Cromatografía por intercambio iónico.

Las fracciones con actividad hemaglutinante obtenidas en el fraccionamiento por filtración por gel fueron repurificadas por intercambio iónico. Primero se procedió a equilibrarlas con una solución tampón inicial de 0,01M TRIS, 0,05M CaCl₂, pH 7,30 y a concentrarlas por ultrafiltración utilizando una membrana AMICON UM-2. Cinco mL de la solución anterior se aplicaron a una columna (2,70X 36 cm) empacada con DEAE - Sephadex A-50, previamente equilibrada con la solución inicial. El material no adherido a la matriz fue eluído con la solución tampón inicial. Cuando la densidad óptica a 280 nm fue menor de 0,06 unidades, se aplicó un gradiente lineal hacia una solución de 0,50M NaCl en 0,01M TRIS + 0,05M CaCl₂, pH 7,3. Se procedió a llenar la cámara de mezclado con 1000 mL de la solución tampón inicial y 1000 mL de 0,50M NaCl + 0,05M CaCl₂ en 0,01M TRIS, en el segundo reservorio. Se utilizó un flujo de 60 mL por hora por medio de una bomba peristáltica. Se recogieron tres tubos por hora y se les midió la densidad óptica a 280 nm y la actividad hemaglutinante.

2.1.3 -Afinidad cromatografica.

Las fracciones con actividad hemaglutinante obtenidas en el fraccionamiento por intercambio iónico se concentraron por ultrafiltración y se pasaron por un filtro milipore. Se equilibró una columna empacada con sefarosa unida covalentemente con galactosa con un volumen de lecho de 5 mL, con una solución tampón de 0,01M TRIS, 0,05M CaCl₂, pH 7,50. Diez mL del filtrado hemaglutinante se aplicaron a la columna y se eluyó la proteína no fijada hasta obtener una densidad óptica a 280 nm de 0,023. La proteína fijada a la columna se eluyó con una solución tampón de 0,01M TRIS, 0,05M CaCl₂, 2M galactosa, pH 7,50. Las fracciones hemaglutinantes que se unieron a la resina se dializaron y concentraron con una membrana AMICON UM-2. por ultrafiltración.

2.2 METODOS PARA DETERMINAR EL GRADO DE PUREZA

2.2.1 - Electroforesis en gel de acrilamida

La electroforesis se efectuó en un gel de corrida constituido por acrilamida al 7 por ciento y un gel separador con acrilamida al 3 por ciento en una solución tampón de 0,025M TRIS + 0,192M glicina, pH 7,30 por 90 minutos en un aparato CANALCO. Las bandas proteicas se tiñieron con una solución 0,25 por ciento de azul de Coomasie en 50 por ciento de ácido tricloroacético y con la tinción de ácido peryódico-Schiff para glicoproteínas (Laemmli 1970) (Hames y Rickwood 1981).

2.2.2 - Determinación del punto isoelectrico

a - Electroenfoque preparativo

El material hemaglutinante obtenido por filtración por gel, dializado y liofilizado se disolvió en una solución formada por 7,20g de urea, 1,87 mL del anfolito estéril en 60 mL de agua destilada y se aplicó al gradiente de sacarosa. El electroenfoque preparativo se efectuó a 5°C en una columna LKB de 440 mL (tipo 8102) con una concentración final de 1 por ciento de los anfolitos acarreadores (Ampholine), con un ámbito de pH de 4 a 6. La solución catódica (0,10 g de hidróxido de sodio, 30 g de sacarosa y agua destilada para 50 mL) se colocó en el compartimento del electrodo central. La solución anódica (0,20 mL de ácido sulfúrico concentrado en 60 mL de agua destilada), se estratificó sobre la parte superior del gradiente. El tiempo de corrida fue de 72 horas a una temperatura de 5°C y a un potencial final de 450 v. Al finalizar la corrida se eluyó el gradiente, con una bomba peristáltica a 15 mL por hora, recogiendo fracciones de 2,50 mL a las que se les midió la densidad

óptica a 280 nm, el pH y la actividad hemaglutinante (Stewart-Tull y Arbuthnott 1971)

b -Electroenfoco analítico

Se produjo un gradiente de pH en un gel de agarosa IEF al 1 por ciento con anfólitos (Ampholine) en dos ámbitos de pH (3,50 - 10) y (4 - 6) al 3,33 y 1,66 por ciento respectivamente. Como solución catódica y anódica se utilizó hidróxido de sodio 1M y ácido sulfúrico 0,05M. Se aplicaron muestras de 40uL (1ug/uL) de lectina y marcadores del punto isoelectrónico SIGMA (inhibidor de tripsina (4,55), anhidrasa carbonica B (5,85), mioglobina (6,76 - 7,16), tripsinógeno (9,30) y rojo de metilo (3,75). El isoelectroenfoco se corrió con un aumento de voltaje de 290 a 1000v en un período de 95 minutos. Se trasladó el gel a una solución fijadora de ácido sulfosalicílico al 5 por ciento y ácido tricloroacético al 10 por ciento. Se lavó el gel con etanol al 35 por ciento y ácido acético al 10 por ciento. Se tiñó el gel con una solución colorante de azul de Coomassie al 0,20 por ciento disuelto en etanol al 35 por ciento y ácido acético al 10 por ciento. Finalmente se lavó el gel con agua destilada y se le agregó solución decolorante dejándola permanecer en contacto con el gel hasta obtener una buena definición de las bandas (Pharmacia Fine Chemicals, 1979,1980).

2.2.3 - Determinación del peso molecular

a - Por filtración por gel

Se utilizó la misma columna descrita anteriormente empacada con Sephadex G-100 y equilibrada con la misma solución tampón. Como muestra se aplicó a la columna 100 mg del extracto crudo liofilizado en 3 mL de solución tampón. Se recogieron fracciones de 5,60 mL en un colector de fracciones LKB. A cada fracción se le determinó la densidad óptica a 280 nm. Se trazó un gráfico semilogarítmico del logaritmo del peso molecular contra el volumen de elución relativo (V/V₀). Para medir el volumen de exclusión se usó a la dextrana azul y como patrones del peso molecular a la albúmina humana (fracción v), pepsina y ribonucleasa (Whitaker 1963).

b -Por electroforesis en gel de acrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS).

Tres muestras de lectina (0,72 ug/uL) en 0,01M TRIS, pH 7,30 se diluyeron al doble con la solución tampón de muestra (0,125M TRIS - HCL al 8 por ciento, 12,80 por ciento SDS al 10 por ciento y 9,60 por ciento glicerol). La primera muestra se trató con 14,4M B- mercaptoetanol al 5 por ciento, la segunda con 0,10M EDTA disódico al 5 por ciento y la tercera sólo con la solución tampón de muestra. Como marcadores de peso molecular a una concentración de 2,50 ug/uL se utilizaron las siguientes proteínas, albúmina bovina (68000), inmunoglobulina G, cadena pesada (50000) ovoalbúmina (43000), inmunoglobulina G, cadena liviana (25000), mioglobina (17200) y lisozima (14300). Las soluciones se calentaron en un baño de agua hirviendo por 3 minutos. En la celda de los electrodos se utilizó una solución tampón de 0,025M TRIS, 0,192M glicina y 0,10 por ciento de SDS, pH 8,30. El azul de bromofenol se utilizó como indicador del frente de corrida. Esta se hizo en un principio a una corriente de 15mA/gel y cuando la muestra alcanzó

el gel separador se le aplicó una corriente constante de 30 mA/gel. La duración de la corrida fue de 258 minutos. El gel se tiñó con azul de Coomasie. Las distancias de migración de las proteínas se graficaron contra el logaritmo del peso molecular de los estándares.

2.3 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

2.3.1 - Determinación de hexosas en la molécula de *Erythrina costaricensis*.

Se construyó una curva de calibración con una solución de galactosa-manosa (8mg/mL). A 1 mg/mL de la lectina purificada en la solución tampón de 0,01M TRIS, 0,05M CaCl₂, pH 7,5 se le agregó 8,50 mL de reactivo de orcinol-ácido sulfúrico. Los tubos se agitaron y colocaron en un baño a temperatura constante de 80°C por 15 minutos y luego se enfriaron en agua a temperatura ambiente. Se determinaron las densidades ópticas a 540 nm (Winzler 1961).

2.3.2 - Determinación del ácido siálico.

Se utilizó 1 mg de proteína hemaglutinante liofilizada, la cual se hidrolizó con ácido sulfúrico 0,10N a 80°C. A 0,20 mL de la muestra tratada, se le agregó 0,10 mL de solución de peryodato. Los tubos se agitaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 20 minutos. Se agregó 1 mL de la solución de arsenito. Se formó un color pardo

amarillento que desapareció con la agitación de los tubos. A cada tubo se le agregó 3 mL de ácido tiobarbitúrico al 0,60 por ciento en sulfato de sodio 0,50M y se calentó en un baño de agua hirviendo por 15 minutos. Los tubos se trasladaron a un baño de agua fría por 5 minutos. El volumen de los tubos fue de 4,30 mL y a cada uno de ellos se les hizo una extracción con 4,30mL de ciclohexanona y se centrifugó por 3 minutos para poder lograr una buena separación de las fases. La densidad óptica de la fase orgánica se determinó a 549 nm. La concentración de ácido siálico se determinó por la ecuación:

$$\text{Moles de ácido N-acetil neuramínico} = \frac{V \times D.O_{549}}{57}$$

donde V es el volumen final de la solución analizada (Warren 1959).

2.3.3 -Titulación del poder aglutinante con diferentes eritrocitos

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 alícuotas de 50 uL de 1 mg/ mL de lectina al doble con solución salina.

Estas se mezclaron con 25 uL de una suspensión de eritrocitos al 6 por ciento en solución salina de conejo, carnero, caballo, cabra, rata y pollo. Al cabo de una hora se hicieron las correspondientes lecturas de aglutinación (Cumsky y Zusman 1979).

2.3.4 Efecto de iones diferentes sobre la aglutinacion

La titulación se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento del punto anterior con las siguientes modificaciones. Se usó una solución de *Erythrina costaricensis* en solución tampón de TRIS, NaCl, pH 7,40 y soluciones 0,10M de CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ y EDTA en la solución tampón. Se utilizaron eritrocitos humanos del grupo sanguíneo O, Rho (D+).

2.3.5 -Estabilidad de la lectina a la temperatura

Alicuotas de una solución de *Erythrina costaricensis* de 0,10 mg/ mL en solución tampón de 0,01M TRIS, 0,05M CaCl₂, pH 7,30, se calentaron simultáneamente en baños de agua a las temperaturas de 40, 50, 60, 70 y 80°C, respectivamente durante 5 minutos. Luego de enfriar cada muestra en un baño de hielo se tituló la actividad hemaglutinante (Broekaert et al 1984).

2.3.6 -Estabilidad de la lectina al pH

Se prepararon soluciones del extracto crudo de *Erythrina costaricensis* (5 mg/mL de proteína) en una solución salina de fosfatos (1,50 mM KH₂PO₄, 10mM Na₂HPO₄, 3mM KCl y 140 nM NaCl) ajustada con HCl o NaOH a pH 2, 3, 4, 6, 8, 10 y 12. Después de incubar a temperatura ambiente por una hora, se tituló la actividad hemaglutinante utilizando una solución tampón de 0,20M TRIS-HCl, pH 7,80 para las diluciones seriadas (Broekaert et al 1984).

2.3.7 - Actividad fisiológica.

En un experimento tipo, la lectina pura de *Erythrina costaricensis* en una concentración de 3,30 mg/ Kg se inoculó intravenosamente en ratas (Sprague-Dowley) de 0,321 Kg de peso, no anestesiadas . Se monitorizó la presión arterial carótida en un polígrafo fisiológico Hewlett Pachard, modelo 7754 A equipado con un amplificador de presión modelo 8805 C.

2.3.8 -Determinacion del espectro de absorción ultravioleta

Se le determinó el espectro de absorción a la lectina (1 mg/mL) en una solución tampón de 0,01M TRIS, 0,05M CaCl₂, pH 7,40, en el ámbito de 240 - 300 nm, a temperatura ambiente en un espectrofotómetro Beckman modelo 25.

3. RESULTADOS

El fraccionamiento de 100 mg de extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis* en una columna empacada con Sephadex G-100 se muestra en la figura 1. Se obtuvieron 4 diferentes fracciones numeradas del I al IV. La actividad hemaglutinante sólo se demostró en la fracción II.

En la figura 2 se muestra la repurificación del material hemaglutinante proveniente de 1 g de extracto crudo bajo las condiciones anteriormente citadas.

La purificación por intercambio iónico, en una columna empacada con DEAE - Sephadex A-50, se muestra en la figura 3. El material hemaglutinante fue eluído con la solución tampón inicial quedando adherida a la resina intercambiadora, proteína contaminante la cual fue eluída posteriormente con el gradiente salino.

Para la obtención de una lectina altamente purificada se procedió a efectuar una cromatografía de afinidad, utilizando la galactosa como ligando acoplada covalentemente a sefarosa 4 B (figura 4).

En la figura 5 se muestra el isoelectroenfoque del material hemaglutinante obtenido por filtración por gel (figura 1). La lectina isoelectroenfocó en el ambito del gradiente de pH comprendido entre 5,86 a 6,00.

En la figura 6 se muestran los geles correspondientes a la electroforesis en acrilamida del extracto crudo y de la lectina purificada. Se observa la presencia de 10 bandas proteicas pertenecientes al extracto crudo y de una única banda protéica correspondiente a la lectina purificada.

En la figura 7 se observa la tinción con el reactivo de ácido peryódico-Schiff (P.A.S.S).

La figura 8 muestra los resultados de la determinación del peso molecular utilizando el método de filtración por gel con Sephadex G-100. La masa molecular relativa se calculó por extrapolación de la curva obtenida y su valor es de 58 kDa.

La figura 9 muestra la determinación del peso molecular de la lectina por el método de electroforesis en gel de acrilamida con SDS, estableciéndose una masa relativa de 29,51 kDa.

En la figura 10 se observa una única banda en condiciones reductoras con B-mercaptoetanol y en condiciones no reductoras, mientras que con EDTA se observan dos bandas tenues además de la banda citada.

La figura 11 muestra 4 isolectinas con puntos isoeléctricos de 5,70, 5,90, 6,13 y 6,50 de la *Erythrina costaricensis*, al utilizar el método de isoelectroenfoque analítico. En la figura 12 se observa la curva de los estándares del punto isoeléctrico analítico.

El porcentaje de hexosas expresadas como manosa-galactosa en una relación 1:4 en la molécula de la lectina de *Erythrina costaricensis* es de 6,5 por ciento determinado por el método de orcinol-ácido sulfúrico de Winzler (Figura 13).

En el cuadro 1 se presenta la titulación del poder de aglutinación de la lectina sobre diferentes eritrocitos de animales.

El cuadro 2 muestra la titulación de la actividad hemaglutinante sobre el grupo sanguíneo O, Rho (D) positivo en presencia de CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 y EDTA. Se observa que tanto el CaCl_2 como el MnCl_2 son activadores que aumentan de igual manera la capacidad hemaglutinante de la lectina, mientras que el EDTA ejerce un efecto inhibitorio.

En la figura 14 se aprecia la estabilidad de la lectina calentada a diferentes temperaturas por 5 minutos. Esta es estable entre 30 y 70°C, experimentando una pérdida completa de la actividad a los 80°C.

La figura 15 muestra la estabilidad de la lectina a diferentes pH por 60 minutos. La actividad de la lectina se mantuvo igual en el ámbito de pH de 2 a 10, perdiéndose a pH 11.

La figura 16 muestra el registro de la presión arterial de una rata Sprague-Dowley de 0,321 Kg de peso que fue inyectada intravenosamente con 3,30 mg de lectina por Kg de peso

La figura 17 muestra el espectro de absorción de la lectina en el ámbito de 240-300 nm.

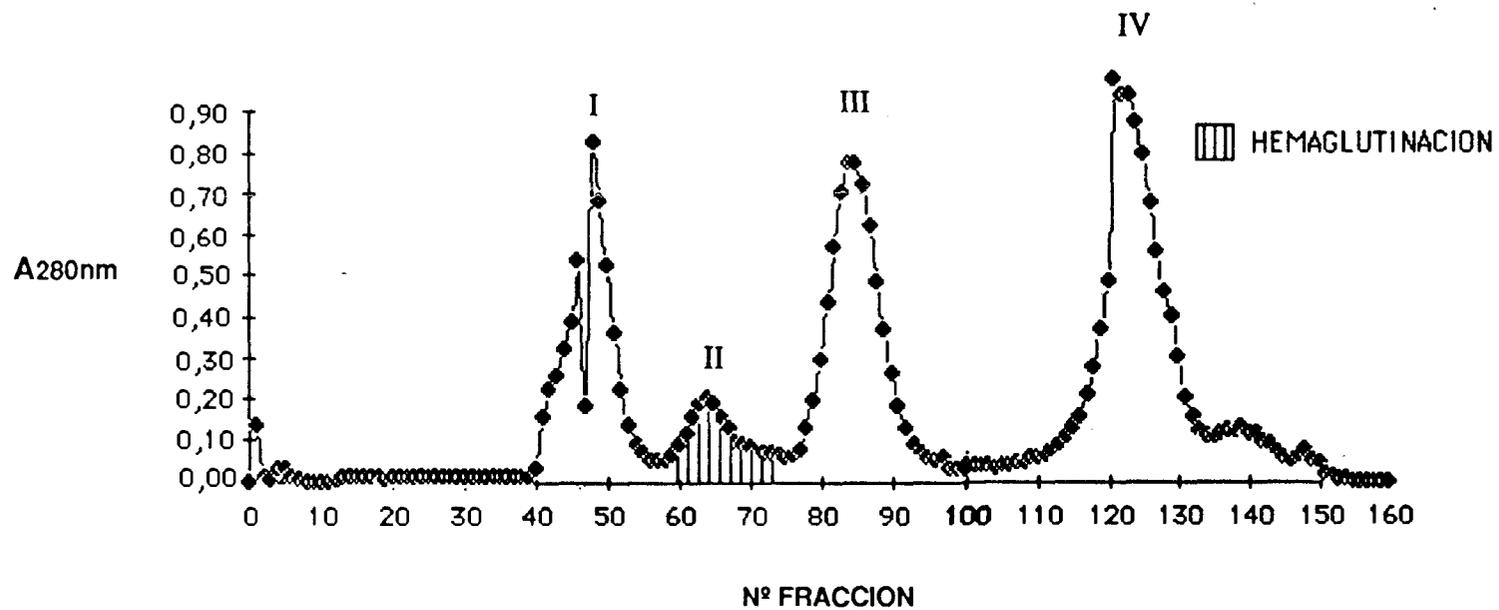


Fig 1. Filtración por gel del extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis*.
 El material con actividad hemaglutinante se localizó en el pico II (fracciones 59-73). Los picos I, III y IV representan el material proteico sin actividad hemaglutinante.

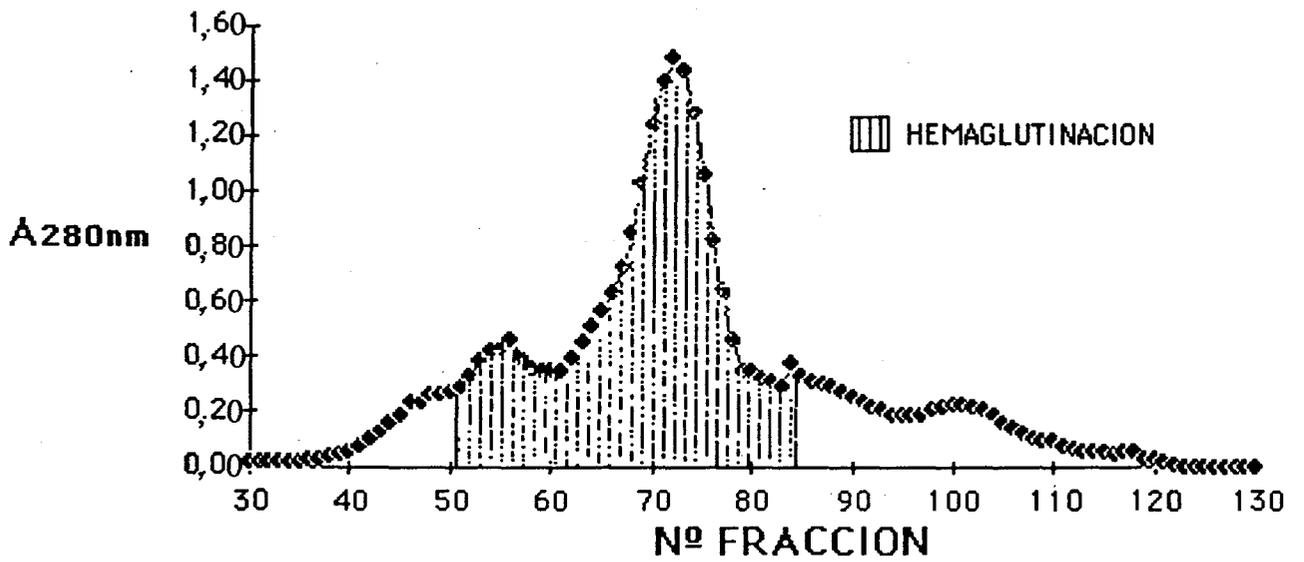


FIG 2. Repurificación por filtración por gel en Sephadex G-100 del material con actividad hemaglutinante (Fig 1, tubos 59-73) La actividad hemaglutinante se localizó entre las fracciones 50-85.

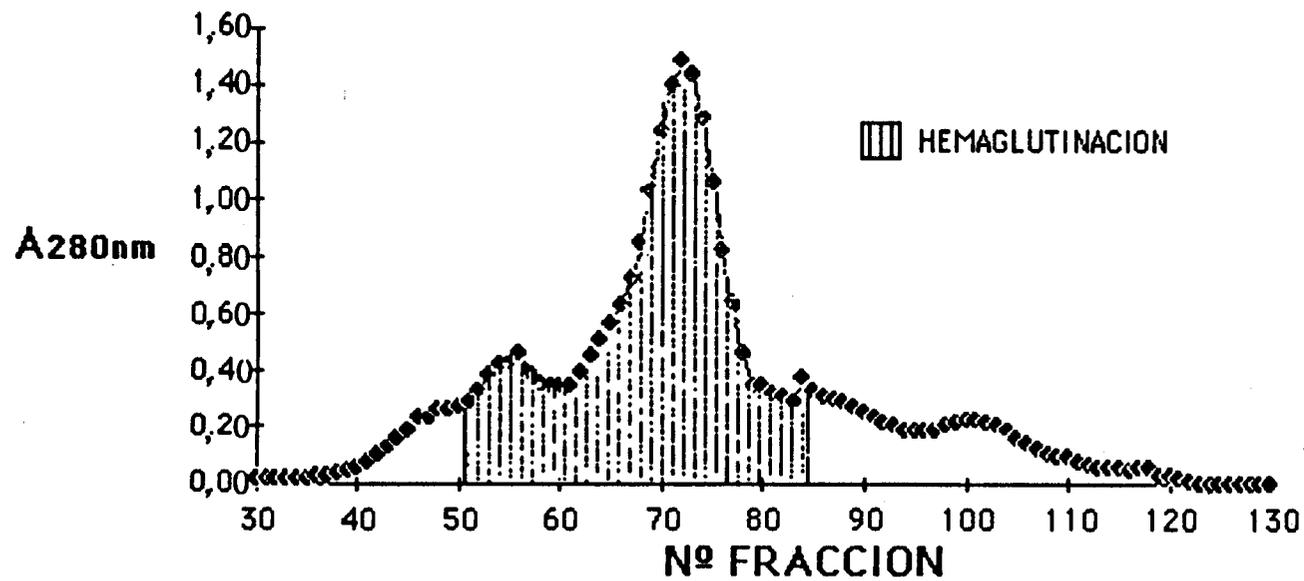


FIG 2. Repurificación por filtración por gel en Sephadex G-100 del material con actividad hemaglutinante (Fig 1, tubos 59-73) La actividad hemaglutinante se localizó entre las fracciones 50-85.

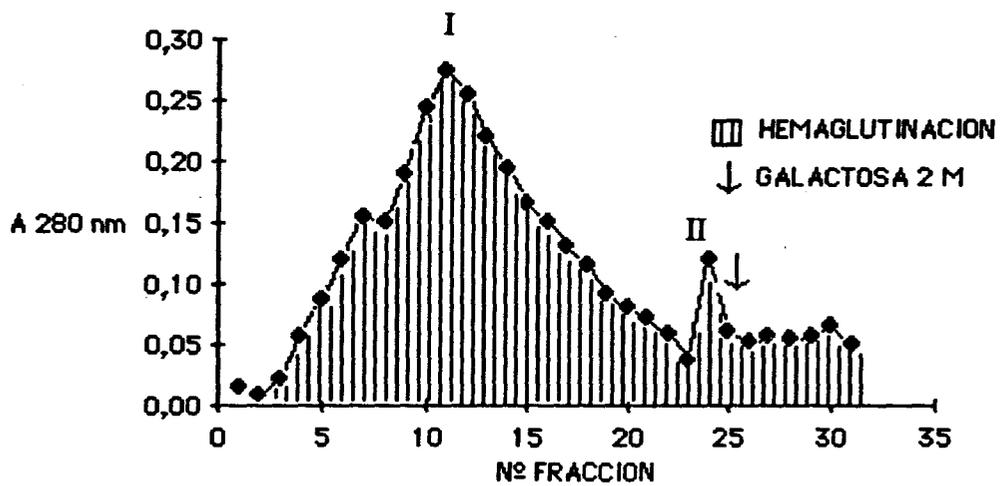


FIG 4. Cromatografía de afinidad de la lectina purificada por intercambio iónico.

El material con actividad hemaglutinante que no se adherió a la columna (fracciones 1-23) se eluyó con la solución tampón inicial de Tris 0,01 M, CaCl_2 0,05 M, pH 7,50. El segundo pico (fracciones 24-31) correspondió al material hemaglutinante que se adherió a la columna y se eluyó con la solución tampón de Tris 0,01 M, CaCl_2 0,05M, galactosa 2 M, pH 7,50.

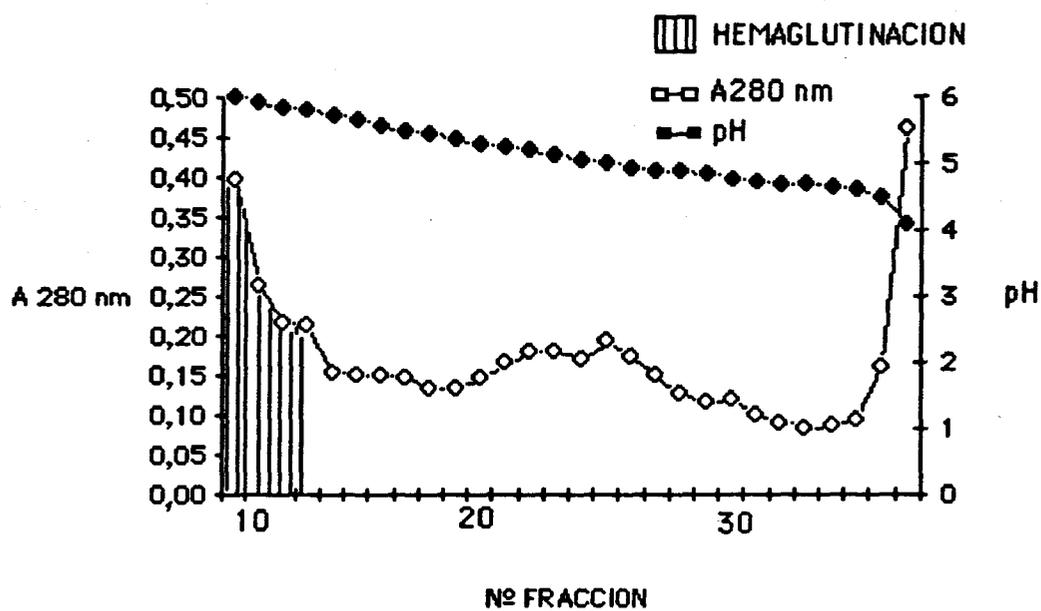


FIG 5. Isoelectroenfoque preparativo de la fracción hemaglutinante obtenida por filtración por gel (Fig 1, fracciones 59-73). La actividad hemaglutinante se localizó en el ámbito del gradiente de pH comprendido entre 5,86-6,00.

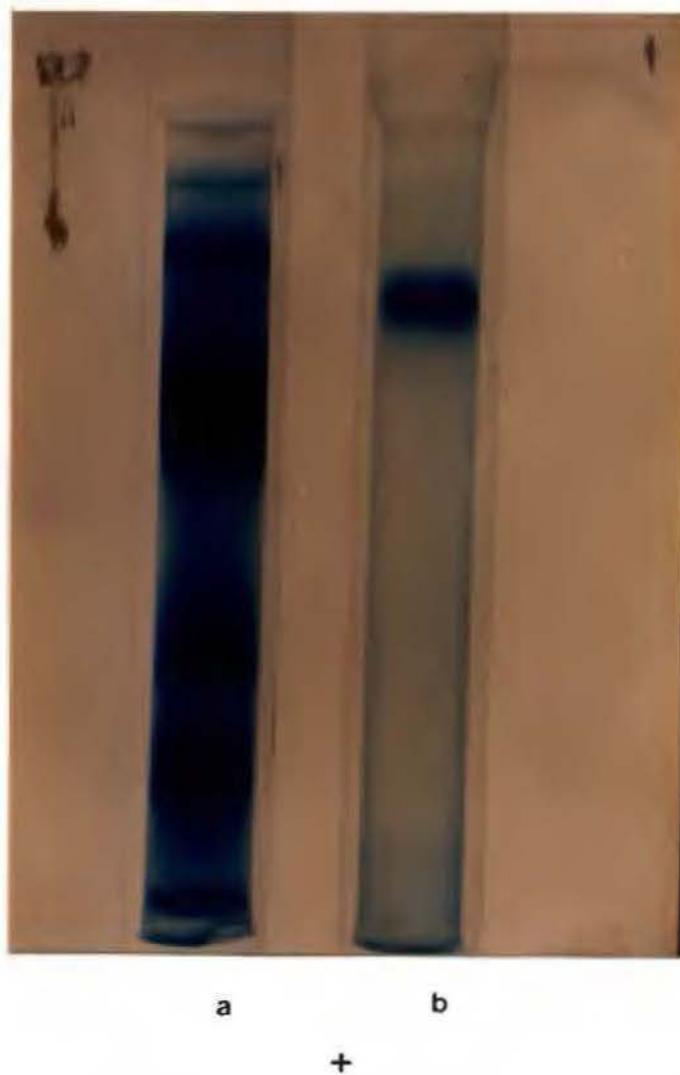


Fig.6. Electroforesis en gel de acrilamida , pH 8,40.
a) extracto crudo de la semilla de *Erythrina costaricensis*.
b) lectina purificada por afinidad cromatográfica.

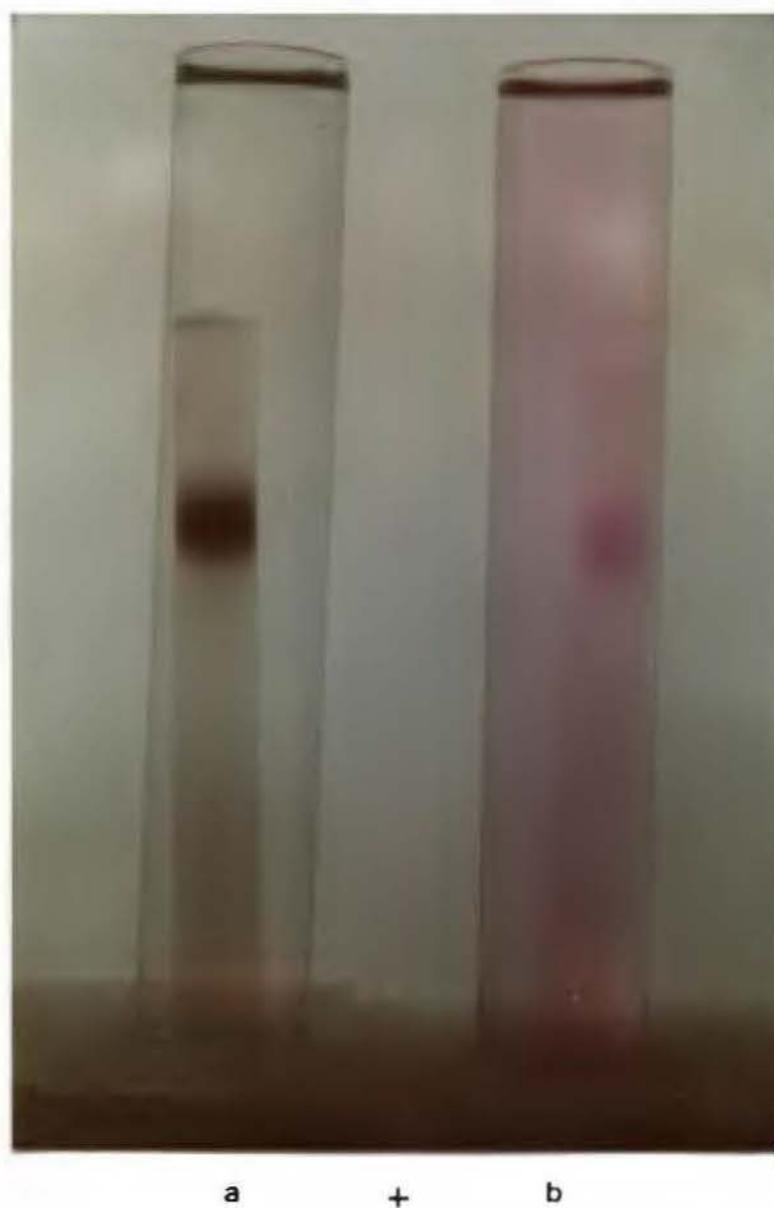


Fig.7. Electroforesis en gel de acrilamida (pH 8,40)
de la lectina purificada por afinidad cromatográfica.
Gel teñido con:

- a) Azul de Coomasie
- b) P.A.S.S (Acido peryódico- Schiff)

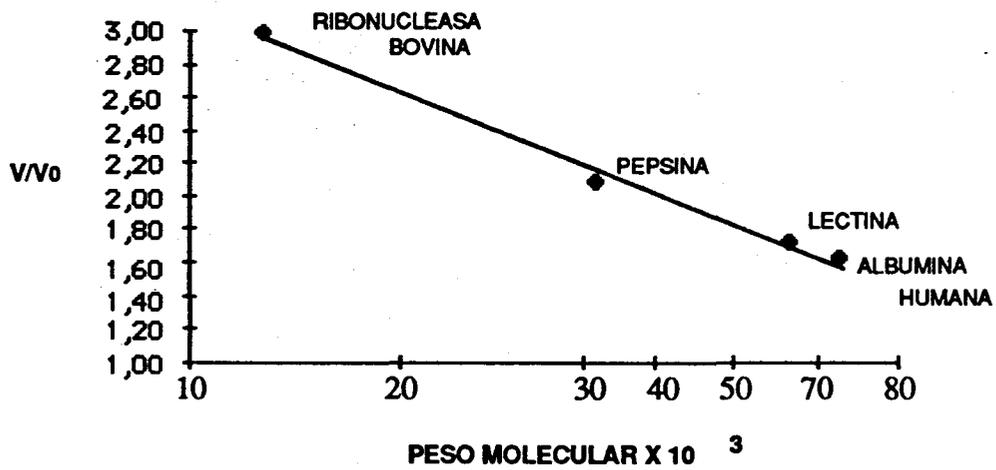


FIG 8. Determinación del peso molecular de la lectina de *Erythrina costaricensis* por filtración por gel. El valor extrapolado en el gráfico correspondió a una masa relativa de 58 kDa.

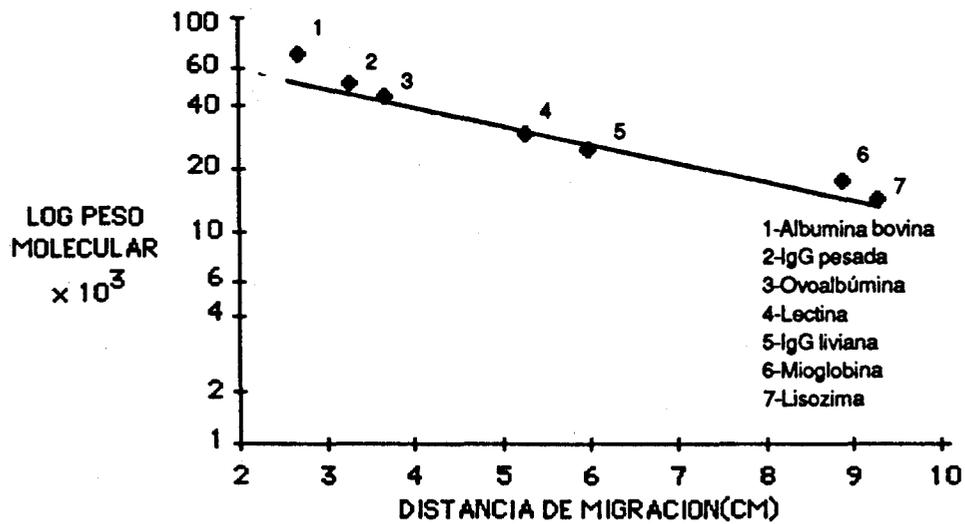


FIG 9. Determinación del peso molecular de la lectina de *Erythrina costaricensis* por electroforesis en gel de acrilamida.

El valor extrapolado en el gráfico correspondió a una masa relativa de 29,51 kDa.

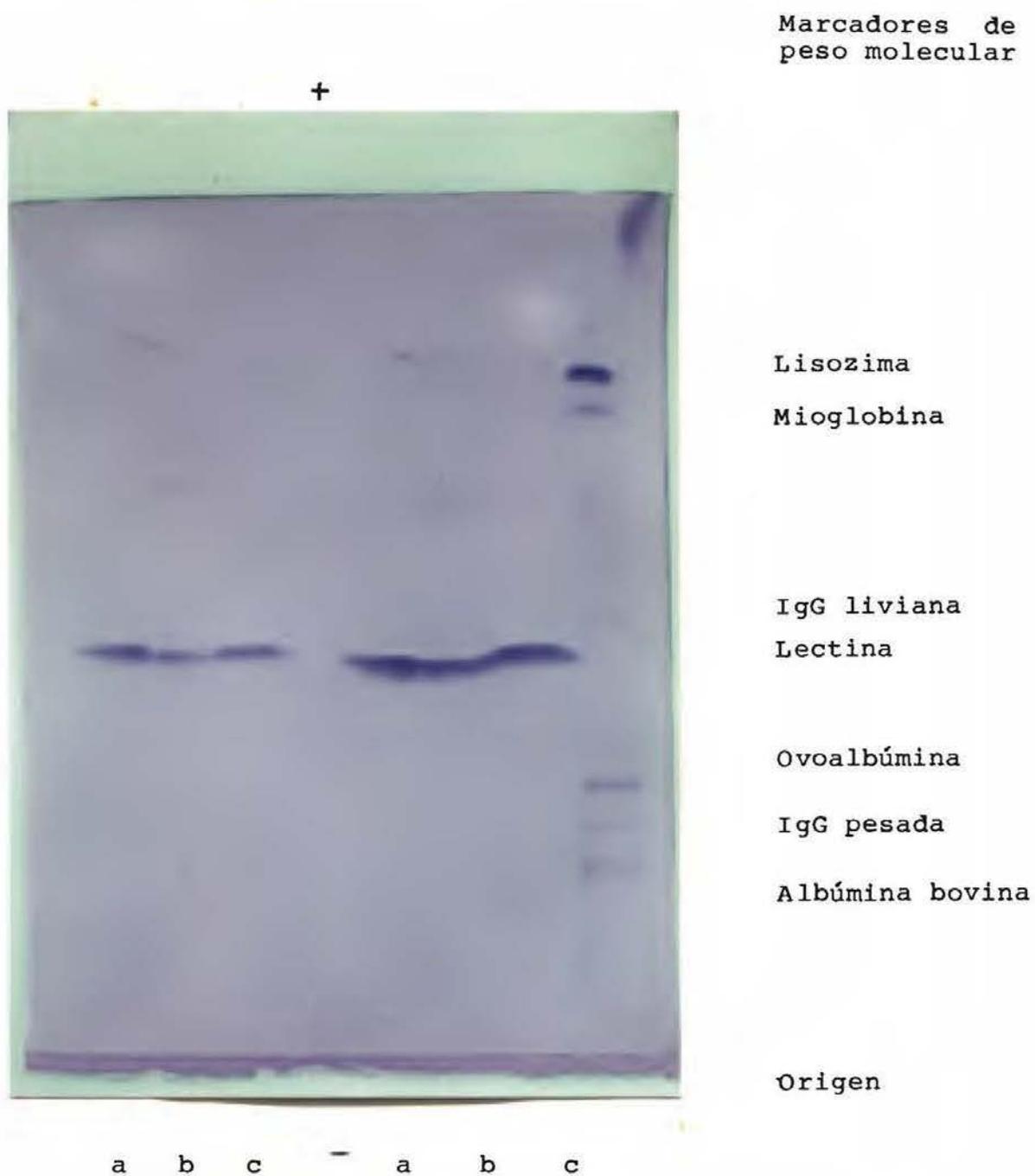


Fig. 10. Electroforesis en gel de acrilamida de la lectina pura en presencia de
 a) S.D.S
 b) EDTA
 c) B mercaptoetanol



+

Fig.11. Determinación del punto isoeléctrico por isoelectroenfoque analítico.

a) Tripsinógeno	(9,30)	f) Lectina 1	(6,50)
b) Mioglobina	(7,16)	g) Lectina 2	(6,13)
c) Mioglobina	(6,76)	h) Lectina 3	(5,90)
d) Anhidrasa carbónica	(5,85)	i) Lectina 4	(5,70)
e) Inhibidor de tripsina	(4,55)		

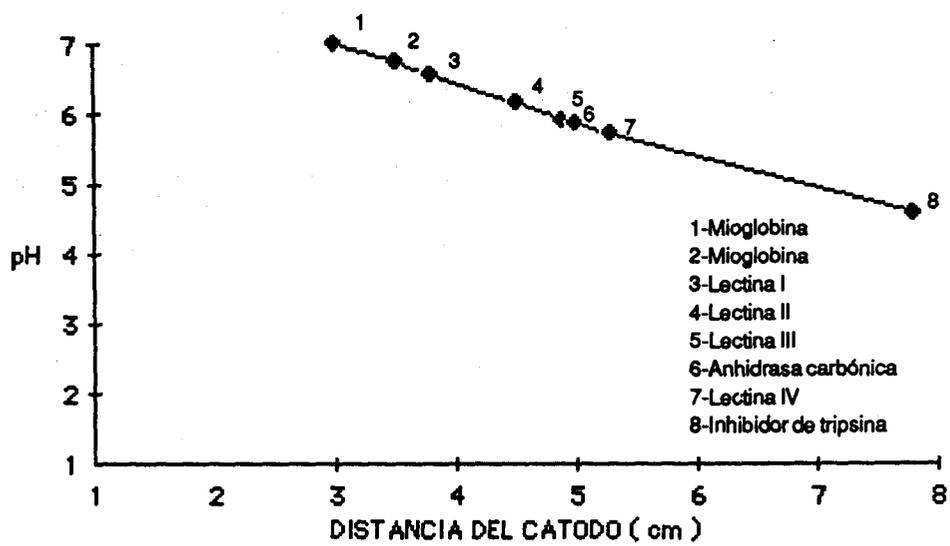


FIG 12. Isoelectroenfoque analítico de la lectina de *Erythrina costaricensis*.

La lectina se localizó en los valores del punto isoeléctrico correspondientes a pH 5,70 ,5,90, 6,13 y 6,50.

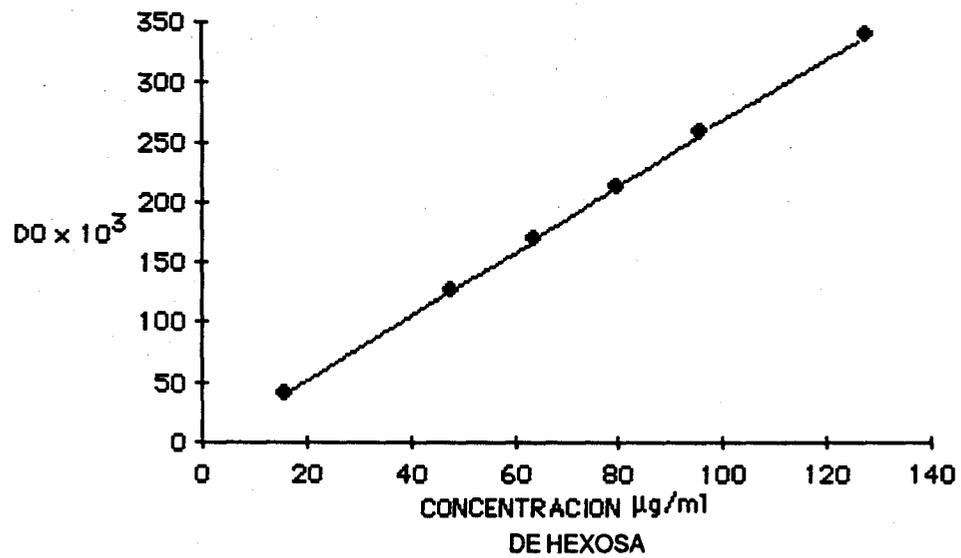


FIG 13. Curva estándar para la determinación de hexosas por el método de Winzler.

El valor de hexosas expresado como galactosamano (1+1) en la molécula de lectina de la semilla de *Erythrina costaricensis* fue de 6,50%.

ERITROCITOS AL 6 POR CIENTO EN SOLUCION SALINA	TITULO DE LA DOSIS MINIMA DE HEMAGLUTINACION
Caballo	0
Cabra	0
Carnero	0
Conejo	1 : 1
Pollo	1 : 2
Rata	0

Cuadro 1. Titulación del poder de aglutinación de la lectina de *Erythrina costaricensis* sobre los eritrocitos de caballo, cabra, carnero, conejo, pollo y rata al 6 por ciento en solución salina.

TITULO DE LA DOSIS MINIMA DE
HEMAGLUTINACION

TRIS- NaCl	0,10M	1 : 64
CaCl ₂	0,10M	1 : 256
MgCl ₂	0,10M	1 : 64
MnCl ₂	0,10M	1 : 256
EDTA	0,10M	1 : 32

Cuadro 2. Titulación del poder de aglutinación de la lectina de *Erythrina costaricensis* sobre el grupo sanguíneo humano O, Rho (D) positivo en presencia de CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂ y EDTA, 0,1M en solución tampón de 0,10M TRIS + NaCl, pH 7,40.

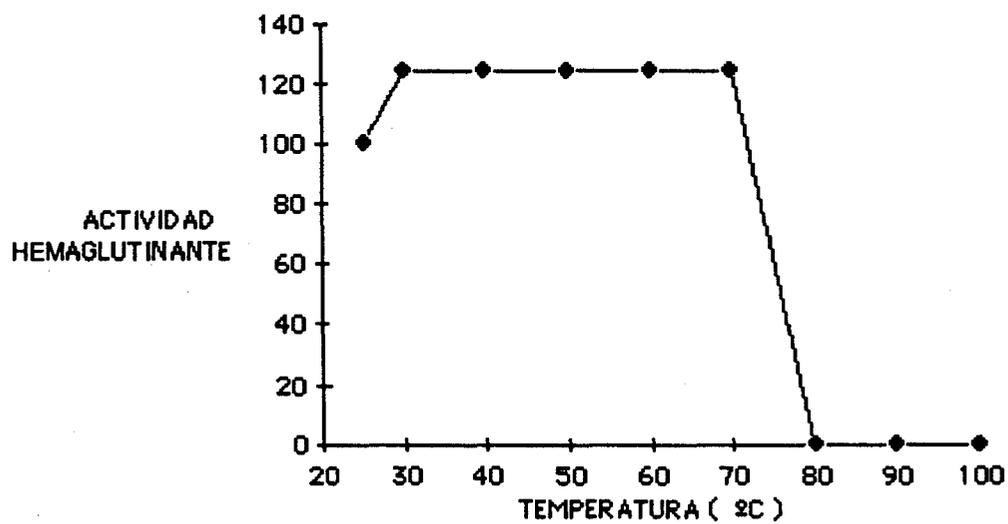


FIG 14. Efecto de la temperatura sobre la actividad hemaglutinante de la lectina de *Erythrina costaricensis*.

La lectina es estable entre 25º y 70º C.

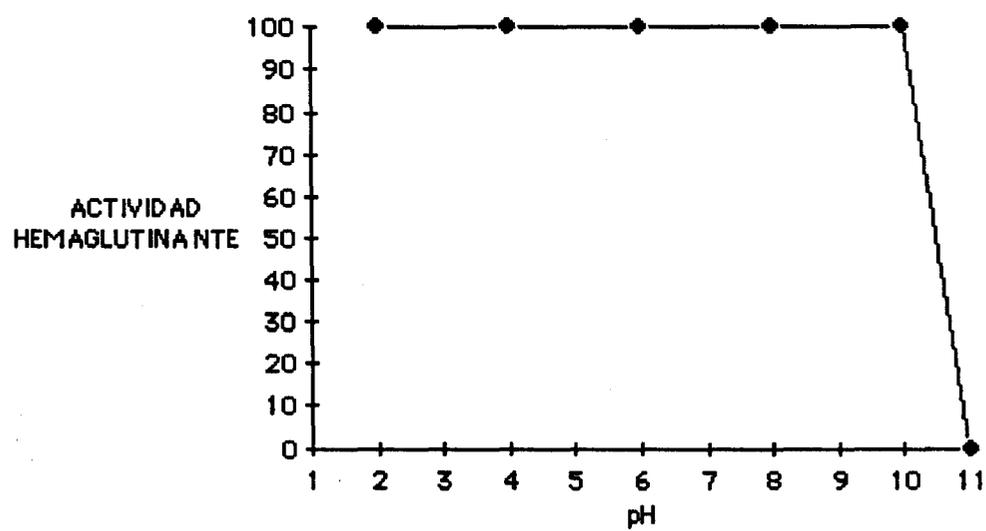


FIG 15. Efecto del pH sobre la actividad hemaglutinante de la lectina de *Erythrina costaricensis*.
La lectina es estable en el ámbito de pH de 2 a 10.



FIG. 16. Registro de la presión arterial (P.A.) antes y después de la infusión intravenosa, vía yugular izquierda de 0.5 ml (1.06 mg) de lectina de la semilla de Erythrina costaricensis a una rata no anestesiada.

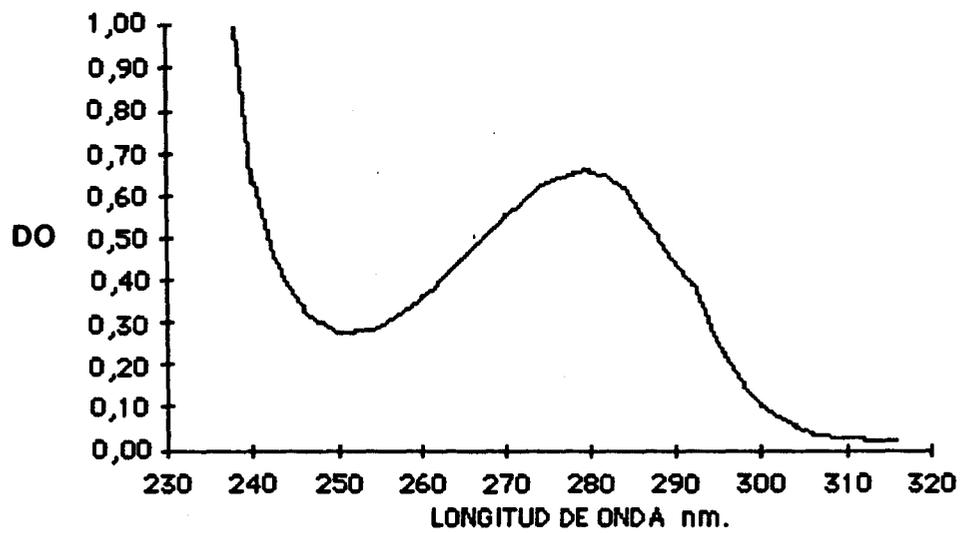


FIG 17. Espectro de absorción de la lectina de *Erythrina costaricensis*.

4. DISCUSION

La cromatografía de filtración por gel en Sephadex, así como la subsecuente purificación por intercambio aniónico utilizando DEAE Sephadex A-50, nos permitió obtener una proteína altamente purificada a juzgar por la única banda proteica visible en la electroforesis en gel de acrilamida (Figura 6).

Sue et al. (1980) utilizaron un procedimiento similar al descrito en este trabajo con el cual, logran separar cuatro fracciones proteicas, una de ellas con actividad hemaglutinante, de los extractos de los huevos de *Rana nigromaculata*.

Sakakibara et al. (1981) trabajando con cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa separaron del extracto de los huevos del pez *Misgurnus anguillicaudatus*, una fracción de lectina de otras tres fracciones proteicas sin actividad. Otros autores que han utilizado un procedimiento similar son por ejemplo, Higuchi et al. (1984), quienes obtuvieron de las semillas maduras de *Psophocarpus tetragonolobus*, dos fracciones, ambas con actividad hemaglutinante. La separación se logró porque una de las lectinas se adhirió a la columna y la otra no. Con este método los autores separaron una lectina ácida y otra básica. Nitta et al. (1983) purificaron la lectina obtenida de renacuajos de *Rana catesbeiana* utilizando lo que estos autores llaman el método clásico de filtración por gel e intercambio iónico. Ellos recurrieron a este procedimiento, después de haber obtenido rendimiento muy pobres al pasar el extracto con actividad de lectina por una columna de afinidad con lactosil-sefarosa. Nitta et al. (1984) separaron tres lectinas de la piel de la rana *Xenopus laevis* utilizando una metodología similar a la nuestra, pasando primero por filtración por gel con Sephadex G-75 y cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa. Sakakibara et al. (1985) trabajando con la lectina específica para el grupo sanguíneo B, obtenida

de los huevos del pez *Plecoglossus altivelis* separaron cinco fracciones, por cromatografía de intercambio iónico con DEAE celulosa de las cuales, solo una tenía actividad hemaglutinante. Con el objeto de purificar aún más la lectina, ésta se pasó por una columna de sefarosa unida covalentemente a galactosa. La galactosa no fue un ligando efectivo ya que la proteína se retuvo muy pobremente por dicha columna.

La proteína hemaglutinante obtenida de la semilla de *Erythrina costaricensis* está constituida por una única cadena polipeptídica con una masa relativa aproximada de 29,51 kDa a juzgar por la electroforesis en gel de acrilamida en condiciones reductoras con B-mercaptoetanol, en presencia de S.D.S y EDTA. Por el método de filtración por gel se obtuvo una masa relativa de 58 kDa.

Analizando estos resultados se puede inferir que la proteína hemaglutinante de *Erythrina costaricensis* es fundamentalmente un dímero formado, por dos subunidades aproximadamente del mismo peso molecular y que no están unidas entre si por enlaces disulfuro. La unión entre las cadenas polipeptídicas puede ocurrir a través de iones divalentes como el Ca^{++} y el Mn^{++} ,

Son concordantes con los valores obtenidos para la masa relativa de la lectina de *E. costaricensis* los valores reportados en los trabajos de Bhattacharyya et al.(1981), (1986) quienes estudiaron las lectinas de diferentes Erythrinas determinando que las lectinas de *E. arborescens*, *E. lithosperma* y *E. suberosa* son dímeros con pesos moleculares de 58, 57 y 59 kDa respectivamente, constituidos por sub-unidades con pesos moleculares similares y unidas en forma no covalente. Pérez (1984), trabajando con la lectina de *E. edulis* determinó que es una molécula dimérica con un peso alrededor de 56 kDa, formada por dos sub-unidades idénticas de 27 kDa. Lis et al. (1985) trabajando con las lectinas de nueve especies de *Erythrina* y utilizando los métodos de filtración por gel, ultracentrifugación y electroforesis en gel de acrilamida, determinaron que todas las lectinas estudiadas son diméricas con pesos moleculares cercanos a 60 kDa, constituidas por dos sub-unidades idénticas de 30

kDa. Las lectinas incluidas en esta categoría son *E. caffra*, *E. zeyheri*, *E. stricta* y *E. humeana*. Las lectinas de *E. flabelliformis*, *E. latissima* y *E. perrieri* también son diméricas con pesos ligeramente diferentes.

La técnica de isoelectroenfoque analítico permitió demostrar la presencia de cuatro isolectinas con puntos isoeléctricos de 5,70, 5,90, 6,13 y 6,50. El hecho de que existan varias isolectinas no es inusual. Bhattacharyya et al. (1981) detectaron tres componentes en la determinación del punto isoeléctrico de la lectina de *E. indica*. Pérez (1984) detectó dos isolectinas en la semilla de *E. edulis* con puntos isoeléctricos de 5,40 y 5,50. En otras especies vegetales se han encontrado isolectinas. Higuchi et al. (1984), (1985) y (1986) aislaron dos lectinas, una básica y otra ácida de las semillas maduras de *Psophocarpus tetragonolobus*. Pueppke et al. (1982) determinaron que la lectina encontrada en las semillas de la soya silvestre *Glycine soja* está formada por dos isolectinas con puntos isoeléctricos de 5,90 y 6,10. Así mismo, Roberson y Barondes (1982) encontraron que la lectina de la rana *Xenopus laevis* se separó en cuatro bandas protéicas con puntos isoeléctricos que van de 4,30 a 4,90 utilizando para este estudio el isoelectroenfoque analítico. Vasta et al. (1986) reportaron la presencia de varias isolectinas galactosafílicas en el plasma del tunicado *Didemnum candidum*. Finkelstein y Hanne (1982) encontraron que el *Vibrio cholerae* produce una lectina soluble en la cual se pudo determinar la presencia de tres isolectinas con puntos isoeléctricos de 6,30 5,30 y 4,70. Lynn y Clevette (1986) trabajando con el látex de diecisiete miembros del género *Euphorbia* y de *Elaeophorbia drupifera* encontraron en algunas especies de cinco a trece isolectinas.

El hallazgo de isolectinas en la semilla de *E. costaricensis* nos permite pensar que este fenómeno se deba a que existe una glicosilación variable de las moléculas de proteína. Puede ser que estas isolectinas presenten diferencias en la composición o secuencia de aminoácidos o en la estructura cuaternaria de las moléculas.

Con el mismo método de electroforesis en gel de acrilamida pero utilizando la tinción de PASS, se determinó que la lectina de *E. costaricensis* es una glicoproteína. Este resultado concuerda con las investigaciones realizadas por numerosos autores quienes han determinado que prácticamente todas las lectinas estudiadas son glicoproteínas, con algunas excepciones como la concanavalina A (Jaffe 1980) y la lectina del maní (Brown y Hunt 1978), las lectinas del veneno de las serpientes *Agkistrodon contortrix contortrix*, *Ancistrodon piscivorous leukostoma*, *Crotalus atrox* (Gartner y Ogilvie 1984), *Lachesis muta* (Aragón et al. 1987) y la lectina producida por *Vibrio cholerae* (Finkelstein y Hanne 1982).

Se encontró que la proteína hemaglutinante, posee un 6,50 por ciento de carbohidrato. Este resultado concuerda con los análisis de las dieciseis diferentes lectinas de *Erythrina* estudiadas. Pérez (1984) encontró una concentración de 7,80 por ciento de azúcares neutros en la lectina de *E. edulis*. Lis, Joubert y Sharon (1985), en un estudio con nueve especies de *Erythrina* encontraron que todas las lectinas son glicoproteínas con una concentración entre 3 y 10 por ciento de carbohidratos. Bhattacharyya et al. (1986), trabajando con las lectinas de *E. indica*, *E. arborescens* y *E. lithosperma* encontraron concentraciones de azúcar de 11,20 6,70 y 5,70 por ciento respectivamente. Peña et al. (1988) determinaron un 10 por ciento de azúcares neutros en la molécula de *E. rubrinervia*.

El método del tiobarbiturato de Warren no demostró la presencia de ácido N-acetilneuramínico en la molécula de *E. costaricensis*. Este resultado concuerda con el hecho de que los ácidos siálicos detectados en la naturaleza no se han encontrado en plantas. Hudgin et al. (1984) determinaron que la lectina del hígado de conejo es una glicoproteína en la cual el 10 por ciento del peso seco consiste de ácido siálico, galactosa, N-acetilgalactosamina y manosa.

El hecho de que la lectina de *E. costaricensis* aglutina sólo los eritrocitos de conejo y pollo, permite inferir diferencias significativas en la

estructura de la membrana celular de los eritrocitos estudiados, a nivel de receptores. Nanne (1984) demostró que el extracto crudo de esta lectina aglutinó en forma inespecífica los eritrocitos humanos del sistema ABO, Rho (D)+ y (D)- y mostró afinidad por la lactosa, N- acetilgalactosamina y galactosa. Iglesias et al. (1982) encontraron que la lectina de *E. cristagalli* aglutinó los eritrocitos de conejo. Gilboa-Garber y Mizhari (1981) trabajaron con eritrocitos humanos, de conejo, rata, perro, ratón y carnero, encontrando una actividad hemaglutinante negativa con los eritrocitos de los animales, con excepción de los humanos. Datta y Basu (1981) trabajaron con el extracto crudo de la lectina de *E. variegata* (Linn.) *var orientalis* (Linn. Merrill) tratando de demostrar actividad hemaglutinante con eritrocitos de humano, rata, conejo, cabra, caballo, cuilo, ratón, perro, bovinos, oveja, búfalo, pollo, paloma y rana. Se encontró actividad hemaglutinante solamente con los eritrocitos humanos. Pérez (1984) encontró que la lectina purificada de *E. edulis* aglutinó los eritrocitos de vaca, conejo y sapo, pero no los de caballo y perro. Lis et al. (1985) encontraron diferencias en el grado de aglutinación hacia los eritrocitos de conejo de nueve especies de *Erythrina* como se puede concluir por la experiencia de este trabajo y de otros autores citados, no existe un patrón definido en cuanto a la actividad hemaglutinante de las lectinas de las diferentes especies de *Erythrina* con los eritrocitos de diferentes especies animales.

Se demostró que la actividad hemaglutinante de la lectina de *E. costaricensis* es estimulada por iones divalentes de calcio y manganeso e inhibida por EDTA. Esta dependencia por cationes divalentes ha sido detectada en otras lectinas estudiadas, tanto vegetales como animales. Borrebaeck et al. (1981) demostraron que la lectina de *Dolichos biflorus* requiere en forma absoluta de iones divalentes para unirse a la N-acetilgalactosamina. Alexander et al. (1983) estudiando la lectina discoidina I de *Dictyostelium discoideum*, encontraron que ésta requiere de iones divalentes, preferentemente calcio para su actividad aglutinante. Con respecto a lectinas de invertebrados, Vasta y Marchalonis (1986)

aislaron dos lectinas del plasma del tunicado *Didemnum candidum*, que requieren de iones divalentes para la expresión de la actividad hemaglutinante.

La lectina de *E. costaricensis* es muy estable a altas temperaturas, perdiendo su actividad alrededor de los 80°C. Esta actividad puede ser atribuible a la presencia de interacciones salinas mediadas por iones divalentes como calcio y manganeso, en la molécula de lectina.

Resultados similares a los de este estudio fueron obtenidos por Bhattacharyya et al. (1981) quienes sometieron la lectina de *E. indica* a diferentes temperaturas por varios días, encontrando que ésta perdía gradualmente su actividad a temperaturas superiores a los 50°C, perdiéndola completamente a los 80°C.

Se determinó la estabilidad de la lectina en estudio a diferentes valores de pH, encontrándose que ésta es estable en un ámbito de 2 a 10, perdiéndose su actividad a valores superiores a 10. Roberson y Strength (1983) y Cammue et al. (1985) reportaron que la lectina de la semilla de *Vigna unguiculata* y la lectina de los tubérculos de *Eranthis hyemalis* mantienen su actividad hemaglutinante en el ámbito de pH comprendido entre 2-12 y 3-11 respectivamente.

Aragón et al. (1987), inyectaron ratas intravenosamente con la lectina aislada del veneno de la serpiente *Lachesis muta*, produciendo ésta un marcado y sostenido efecto hipotensor. Aumentando la dosis de la lectina se produjo la muerte de los animales. Tratando de demostrar un efecto fisiológico similar con la lectina de *E. costaricensis* se procedió a inyectar 3,30 mg por Kg de peso, la cual no produjo efecto alguno sobre los animales inoculados.

5. CONCLUSIONES

El estudio de la lectina de la semilla de *Erythrina costaricensis* pone de manifiesto una proteína con propiedades similares a las reportadas del mismo género. Es posible postular que existen diferencias estructurales a nivel de membrana entre los eritrocitos de las diferentes especies estudiadas. No obstante se demostró anteriormente que esta proteína no es útil para diferenciar los grupos sanguíneos humanos.

Una vez aislada, purificada y caracterizada la lectina en estudio, queda por determinar para el futuro en trabajos de investigación posteriores, las posibles aplicaciones de ésta y otras lectinas de *Erythrina* en diferentes campos de la Medicina. Queda por establecer la acción mitogénica, ya que hoy en día se buscan afanosamente compuestos inductores de la mitogénesis que permitan aislar líneas celulares específicas. También debe estudiarse la posibilidad de aislar carbohidratos complejos en solución o sobre superficies celulares lo que podría utilizarse para la investigación y caracterización de cierto tipo de tumores.

6. LITERATURA CITADA

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 hemagglutinins in various seeds. J. Immunol.102:1295-1299.
3. Aragón, F., Brenes, J. R. and Gubensek, F. 1987. Some properties of a lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* snake venom. 18th FEBS Meeting. Ljubljana-Yugoslavia:206.
4. Ashwell, G., and Harford, J. 1982. Carbohydrate-specific receptors of the liver. Ann. Rev. Biochem. 51:531-554.
5. Ashwell, G., and Morell, A. 1974. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv. Enzymol. 41:99-128.
6. Barkai-Golan, R., Mirelman, D., and Sharon, N. 1978. Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *Aspergilli* Arch. Microbiol. 116:119-124.

7. Bhattacharyya, L., Das, P. K., and Sen, A. 1981. Purification and properties of D- galactose binding lectins from some *Erythrina* species. Comparison of properties of lectins from *E. indica*, *E. arborescens*, *E. suberosa*, and *E. lithosperma*. Arch. Biochem. Biophys. 211:459-470.
8. Bhattacharyya, L., Ghosh, A., and Sen, A. 1986. A comparative study on lectins from four *Erythrina* species. Phytochemistry. 25:2117-2122.
9. Borrebaeck, C. A. K., Lonnerdal, B., and Etzler M. E. 1981. Metal ion content of *Dolichos biflorus* lectin and effect of divalent cations on lectin activity. Biochemistry. 20:4119-4122.
10. Boyd, W. C., and Shapleigh, E. E. 1954. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science. 119. 419
11. Brossmer, R., Draeger, B., and Gundert, D. 1975. Cited by: Young, N. M., Watson, D. C., and Williams, R. E. 1984. Structural differences between two lectins from *Cytisus scoparius*, both specific for D-galactose and N-acetylgalactosamine. Biochem. J. 222:41-48.
12. Brown, J. C., and Hunt, R. C. 1978. Lectins. Int. Rev. Cytol. 52:277- 349.
13. Bychkov, V., and Toto, P. D. 1986. Lectin binding to normal, dysplastic and neoplastic cervical epithelium. Am. J. Clin. Pathol. 85:542-547.

14. Calafat, J., and Janseen, H. 1984. Binding of lectins to human mammary tumours: ultrastructural study. Br. Cancer Res. Treat. 4:169-179.
15. Cammue, B. P., Peeters, B., and Peumanns, W. J. 1985. Isolation and partial characterization of an N-acetylgalactosamine specific lectin from winter aconite (*Eranthis hyemalis*) root tubers. Biochem. J. 227:949-955.
16. Casalongue, C., and Pont Lezica, R., 1985. Potato lectin: A cell-wall Glycoprotein. Plant Cell. Physiol. 26: 1533-1539.
17. Datta, T. K., and Basu, P. S. 1981. Identification, isolation and some properties of lectin from seeds of Indian coral tree *Erythrina variegata* (Linn.) var. *orientalis* (Linn.) Merrill Biochem. J. 197:751-753.
18. Elad, Y., Barak, R., and Chet, I. 1983. Possible role of lectins in mycoparasitism. J. Bacteriol. 154:1431-1435.
19. Etzler, M. E., and Kabat, E. A. 1970. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group a specificity from *Dolichos biflorus*. Biochemistry. 9:869-877.
20. Finkelstein, R.A., and Hanne, L.F. 1982. Purification and characterization of the soluble hemagglutinin (Cholera lectin) produced by *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 36:1199-1208.

21. Flores, E. M., y Rivera, D. I. 1984. Clave para semillas y plántulas de las especies del género *Erythrina* en el Valle Central, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 32:241-252.
22. Gartner, T. K., and Ogilvie, M. L. 1984. Isolation and characterization of three Ca²⁺-dependent B-galactoside-specific lectins from snake venoms. Biochem. J. 224:301-307.
23. Gunn, C. R., and Barnes, D.E. 1977. Citado por: Flores, E. M. y Rivera, D. I. 1984. Clave para semillas y plántulas de las especies del género *Erythrina* en el Valle Central, Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 32:241-252.
24. Hannes, B. D., and Rickwood, D. 1981. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. I.R.L. Press Limited. Oxford. England. 290 pp.
25. Higuchi, M., Inoue, K. and Iwai, K. 1984. Occurrence of two electrophoretically different lectins in winged bean. Agric. Biol. Chem. 49:391-398.
26. Higuchi, M., and Iwai, K. 1985. Purification and some properties of the basic lectin from winged bean seeds. Agric. Biol. Chem. 49:391-398.
27. Higuchi, M., Ohtani, Y. and Iwai, K. 1986. Purification and characterization of the acidic lectin from winged bean seeds. Agric. Biol. Chem. 50:1847-1853.

28. Horejsi, V., Tichá, M., Novotny, J. and Kocourek, J. 1980. Some properties of D-galactose binding lectins isolated from the seeds of *Butea frondosa*, *Erythrina indica* and *Momordica harantia*. Biochim. Biophys. Acta. 623:439-448.
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. 123:247-252.
30. Iyer, P. N. S., Wilkinson, K. D. and Goldstein, I. S. 1976. An N- acetyl- D- glucosamine binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. Arch. Biochem. Biophys. 177: 330-333.
31. Jaffe, W. 1980. Hemagglutinins (lectins). Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, 2ed. Academic Press. 502 pp.
32. Kilpatrick, D. C., Graham, C., and Urbaniak, S. J. 1986. Inhibition of human lymphocyte transformation by tomato lectin. Scand. J. Immunol. 24: 11-19.
33. Kocourek, J. and Horejsi, V. 1980. Defining a lectin. Nature. 290.188
34. Komano, H. and Natori, S. 1985. Participation of *Sarcophaga peregrina* humoral lectin in the lysis of sheep red blood cells injected into the abdominal cavity of larvae. Devel. Comp. Immunol. 9: 31-40

35. Kumar, S., Carr, T., Marsden, H. B., and Morris- Jones P. H. 1986. Study of childhood renal tumours using peroxidase conjugated lectins. J. Clin. Pathol. 39:736-741.
36. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.
37. Lis, H., Joubert, F. J., and Sharon, N. 1985. Isolation and properties of N- acetyllactosamine-specific lectins from nine *Erythrina* species. Phytochemistry. 24:2803-2809.
38. Lis, H. and Sharon, N. 1986. Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem. 55:35-67.
39. Lynn, K. R., and Clevette- Radford, N. A. 1986. Lectins from latices of *Euphorbia* and *Elaeophorbia* species. Phytochemistry. 25:1553-1557.
40. Matalanis, G., Gardner, I. D., and Whitehead R. H. 1986. Lectin binding patterns and monoclonal antibodies to epidermal antigens in tumours of the skin. Pathology. 18:206-211.
41. Matsumoto. I., and Osawa, T. 1969. Purification and characterization of an anti-H(0) phytohemagglutinin of *Ulex europeus*. Biochem. Biophys. Acta. 194:180-189.
42. Miranda Santos, I., and Pereira, M. 1984. Lectins discriminate between pathogenic and non pathogenic south American trypanosomes. Am. J. Trop. Med. Hyg. 33:839-844.

43. Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N., and Lotan, R. 1975. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. Nature, 256: 414- 416.
44. Monge, A. 1958. Contribución al estudio de las hemaglutininas vegetales (lectinas). Tesis de Licenciatura. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. 62 pp.
45. Nanne, C. 1984. Extracción y ensayo de una lectina del poró (*Erythrina costaricensis*). Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. 43pp.
46. Nitta, K., Takayanagi, G. and Kawauchi, H. 1983. Partial purification and properties of lectin from *Rana catesbeiana* tadpole. Chem. Pharm. Bull. 31:315-320.
47. Nitta, K., Takayanagi, G., Terasaki, Y. and Kawauchi, H. 1984. Studies on three kinds of lectins from *Xenopus laevis* skin. Experientia, 40:712-713.
48. Ofek, I., Mirelman, D., and Sharon, N., 1977. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature, 265:623-625.
49. Ofek, I. and Sharon, N., 1988. Lectinophagocytosis a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. Infect. Immun:539- 547.
50. Peña, C., Villarraga, F., and Pérez, G. 1988. A lectin from the seeds of *Erythrina rubrinervia*. Phytochemistry 27:1045-1048.

51. Pérez, G. 1984. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina edulis*. Phytochemistry, 23:1045-1048.
52. Perry, A., Keisari, Y., and Ofek, I. 1985. Liver cell and macrophage surface lectins as determinants of recognition in blood clearance and cellular attachment of bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 27:345-350.
53. Peters, W., Kolb, H., and Kolb-bachofen, V. 1983. Evidence for a sugar receptor (lectin) in the peritrophic membrane of the blowfly larva, *Calliphora erythrocephala* Mg (Diptera). Insect. Physiol. 29:275-280.
54. Peumans, W. J., and Stinissen, H. M. 1983. Gramineae lectins: Occurrence, molecular biology and physiological function. Chemical Taxonomy. Molecular Biology and Function of Plant Lectins. Alan. R. Liss. Inc. New York: 99-116.
55. Pharmacia Fine Chemicals, 1979. Flad Bed Apparatus, FBC 3000. Instruction Manual. Off set center, Uppasalla, Sweden.
56. Pharmacia Fine Chemicals, 1980. Agarose IEF. Manual of Instruction. Uppasalla, Sweden.
57. Pueppke, S. G., Benny, U. K., and Hymowitz, T. 1982. Soy bean, *Glycine soja*. Sieb. and Zucc. Plant Sci. Lett. 26:191-197.

58. Roberson, M. M., and Barondes, S. H. 1982. Lectin from embryos and oocytes of *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 7520-7524.
59. Roberson, B. J., and Strength, D. R. 1983. Characterization of a lectin from cowpeas. Prep. Biochem. 13:45-56.
60. Sakakibara, F., Kawauchi, H., Takayanagi, G., 1985. Blood group B- specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (Ayufish) eggs. Biochim. Biophys. Acta . 00:103-111.
61. Sakakibara, F., Takayanagi, G., and Kawauchi, H. 1981. An L-rhamnose-binding lectin in the eggs of *Misgurnus anguillicaudatus*. J. Pharm. So. J. 101:918-925.
62. Schottelius, J. and Da Costa, S.C.C. 1982. Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of *Leishmania* from the New World. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 77:19-27.
63. Sharon, N. 1984. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. Immunol. Today 5:143-147.
64. Shen, Z-W., Sun C., Zhu, Z., Tang, X-h., and Shen, R. J. 1984. Purification and properties of rice germ lectin. Can. J. Biochem. Cell. Biol., 62:1027-1032.
65. Simpson, D. L., Thorne, D. R. and Loh, H. H. 1978. Lectins: Endogenous carbohydrate binding proteins from vertebrate tissues: Functional role in recognition processes. Life Sciences. 22:727-748.

66. 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 Instrument Journal.18:17-21.
67. Stinessen, H. M., Peumans. W. J., and Carlier, A. R. 1983. Occurrence and immunological relationships of lectins in gramineous species. Planta. 159:105-111.
68. Sue, H., Takayanagi, G., Kogeki, T., Nitta, K., Sakakibara, F., and Kawauchi, H.1980. Purification, characterization and antitumor activity of *Rana nigromaculata* lectin. J. Pharm So. J. 100:706-712.
69. Toida, M., Takeuchi, J., Tsukidate, K., Akao, S., Fukatsu, T., Nakashima, N. 1985. Histochemical studies on pseudocysts in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. Histochem. J. 17:913-924.
70. Vasta, G., Hunt, J. C., Marchalonis, J. J. and Fish W. W. 1986. Galactosyl-binding lectins from the tunicate. *Didemnum candidum*. J. Biol. Chem. 26:9174-9181.
71. Vasta, G. R., and Marchalonis, J. J. 1986. Galactosyl- binding lectins from the tunicate *Didemnum candidum*. J. Biol. Chem. 261:9182-9186.
72. Warren. L. A.1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 34:1971-1950.

73. Whitaker, J. K. 1963. Determination of molecular weight of proteins by gel filtration on sephadex. Analyt. Chem. 35:1950.
74. Whitney, P., Maxweel, S., Ryan, U., and Massaro, D. 1985. Synthesis and binding of lactose specific lectin by isolated lung cells. Am. J. Physiol. 248:C258-C264.
75. Winzler, R. J. 1961. Determination of serum glycoprotein. Methods of Biochemical Analysis, Vol.2. (D. Glick, ed.). Interscience Publishers, Inc. New York: 290-292.
76. Yen, Y., Lee M-C., Salzmann, M. and Damjanov, I. 1986. Lectin binding sites on human endocervix: A comparison with secretory and proliferative endometrium. Anat. Rec. 215:262-266.
77. Young, N. M., Watson, D. C., and Williams, R. E. 1984. Structural differences between two lectins from *Cytisus scoparius*, both specific for D-galactose and N-acetylgalactosamine. Biochem. J. 22:41-48.