

## NORMALIZACION DEL METODO DE MIGRACION CAPILAR PARA EVALUAR ERITROAGLUTINACION

\* NAVARRO YOLANDA DE.  
\*\* PÉREZ GERARDO.

Recibido el 27 de abril.

### SUMARIO

Se normalizó el método de migración capilar para evaluar cuantitativamente la aglutinación de eritrocitos por lectinas. Usando este método se analizaron semillas de 18 especies de leguminosas respecto a la presencia eventual de lectinas.

### ABSTRACT

The method of capillar migration to evaluate erythroagglutination by lectins has been standardized. Seeds of 18 species of leguminosae have been analyzed by this method, to detect the eventual presence of lectins.

### INTRODUCCION

Los métodos sencillos más comúnmente utilizados para evaluar la capacidad eritroaglutinante de extractos vegetales son de tipo cualitativo y aquellos de tipo cuantitativo requieren equipos costosos. Por estas razones se consideró interesante normalizar un método cuantitativo sencillo utilizable con eritrocitos humanos o animales.

---

\* Instructor Asociado. D. O. Departamento Química. U. N.

\*\* Profesor Asociado. D. E. Departamento Química. U. N.

Para medir la aglutinación de leucocitos humanos ocasionada por antisueros leucoaglutinantes Thompson et al. (1), han desarrollado el método llamado de "migración capilar", que con algunas adaptaciones ha sido utilizado por Moreno y Arango (2) para medir la aglutinación de leucocitos por Favina. Teniendo en cuenta los estudios anteriores, se ha realizado un estudio sistemático de las variables que intervienen en el método de migración capilar de Thompson et al. (1), lo cual ha permitido normalizar un método cuantitativo que ha sido de gran utilidad para la detección de lectinas en semillas de leguminosas y la cuantificación de su actividad eritroaglutinante.

## MATERIALES Y METODOS

### *Tratamiento de las especies estudiadas.*

Se analizaron 18 especies de leguminosas y según el estado de maduración de las semillas se emplea uno u otro de los siguientes procedimientos:

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

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

### *Preparación de la suspensión de eritrocitos.*

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

### *Determinación de las mejores condiciones experimentales.*

Para estos ensayos se emplearon extractos de semillas de *Crotalaria agatifolia* y *Dioclea lehmannii*, que según los ensayos cualitativos realizados por el método de Sage y Vásquez (3) presentaban respectivamente bajo y alto poder eritroaglutinante.

En primer término, se varió la relación de proteína: buffer (0.3% EDTA, 0.26%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.85% NaCl y 0.1% de gelatina) (pH 6,4) manteniendo constantes la concentración de eritrocitos (2%, v/v), tiempo de incubación 15 minutos, tiempo de migración, tiempo y velocidad de centrifugación.

Posteriormente se varió la concentración total de eritrocitos y la relación extracto de proteína: suspensión de eritrocitos (2%), manteniendo constantes las demás condiciones. Las suspensiones de eritrocitos ensayadas fueron: 10%, 4% y 2% (v/v) en NaCl 1%.

En la determinación del mejor tiempo de migración se realizaron dos ensayos. En el primero se utilizaron 15 minutos de incubación a temperatura ambiente para la mezcla extractos de proteína: buffer: eritrocitos (2%) en relación 1: 1:1 (v/v) y 20 minutos de migración capilar. En el segundo, únicamente, se redujo el tiempo de migración a 15 minutos manteniéndose iguales las restantes condiciones experimentales.

En cuanto al tiempo y velocidad de centrifugación se ensayaron tiempos de 60 y 40 segundos centrifugando a una velocidad de 1.200 rpm (330 g) utilizando un rotor tipo 240 con una centrífuga International modelo CS.

### *Detección de lectinas.*

Una vez determinadas las mejores condiciones (tabla I), se efectuaron los ensayos de aglutinación de acuerdo al siguiente procedimiento:

En un tubo se colocan 0.2 ml de suspensión de eritrocitos (2% v/v) en NaCl 1%), se agregan 0.2 ml de buffer y 0.2 ml de extracto proteico en NaCl 1%. Luego de agitar bien se deja en reposo a temperatura ambiente durante 15 y 60 minutos; al cabo de los cuales se llena un capilar con la solución e inmediatamente se sella por uno de sus extremos con plastilina blanca y se procede a centrifugarlo a 1.200 rpm (330 g) durante 40 segundos. Es importante llenar los distintos capilares a un mismo nivel. A continuación se coloca el capilar, sobre un soporte que forma un ángulo de 45° para que comience la migración de los aglutinados a lo largo del capilar.

Después de 20 minutos éste se coloca horizontalmente sobre una placa de vidrio iluminada; con ayuda de una lupa y a partir del extremo cerrado se mide la distancia (en mm), recorrida por el aglutinado. El valor obtenido se expresa como el porcentaje de migración respecto a la migración de un blanco que representa el 100%. El porcentaje de aglutinación se calcula sustrayendo de 100 el porcentaje de migración.

Las concentraciones de proteína de los extractos utilizados en estos ensayos se determinaron por micro-Kjeldhal (4).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Determinación de las mejores condiciones para la aglutinación de eritrocitos con el método de migración capilar.*

Los resultados obtenidos al estudiar las diferentes variables, se presentan en la tabla I.

#### T A B L A I

*Normalización del método de migración capilar para medir la aglutinación de eritrocitos.*

#### SECCION I

Muestra: *Crotalaria agatifolia*.

Relación extracto proteico - Buffer (v/v)	% Migración	% Aglutinación
1:1 ... ..	70	30
1:2 ... ..	78	22
1:4 ... ..	100	0
1:8 ... ..	82	18
1:18 ... ..	80	20
1:32 ... ..	100	0

#### SECCION II

Muestra: *Crotalaria agatifolia*.

Concentración de eritrocitos % (v/v)	% Migración	% Aglutinación
10 ... ..	93	7
4 ... ..	71	29
2 ... ..	69	31

Muestra: *Dioclea lehmannii*.

Concentración de eritrocitos % (v/v)	% Migración	% Aglutinación
10 ... ..	20	80
4 ... ..	15	85
2 ... ..	9	91

SECCION III

Muestra: *Crotalaria agatifolia*.

Relación extracto proteico - Eritrocitos 2% (v/v)	% Migración	% Aglutinación
1:1 ... ..	69	31
1:2 ... ..	72	28
1:4 ... ..	100	0

Muestra: *Dioclea lehmannii*.

Relación extracto proteico - Eritrocitos 2% (v/v)	% Migración	% Aglutinación
1:1 ... ..	9	91
1:2 ... ..	59	41
1:4 ... ..	70	30

Cuando la relación extracto proteico: buffer disminuye (Sección I), se obtiene una disminución progresiva de la aglutinación, lo cual es explicable por el descenso en la concentración final de lectina; el extracto de *Crotalaria agatifolia* (3.6 mg proteína/ml) utilizado en este ensayo mostró que los mejores resultados se obtienen con una relación 1:1.

Es de anotarse que en la mayoría de los extractos obtenidos, las concentraciones de proteína son similares o mayores a la citada (tabla II).

La variación de la relación extracto proteico: concentración de la suspensión de eritrocitos (Sección II), utilizando suspensiones al 10%, 4% y 2%, y una relación de volúmenes extracto proteico: buffer: suspensión de eritrocitos 1:1:1, permite establecer que mientras mayor sea la concentración de eritrocitos se obtienen menores porcentajes de aglutinación, debido posiblemente a la formación de aglutinados que involucran un bajo número de células que se comportarían durante la migración como eritrocitos aislados. Para este ensayo se emplearon extractos de bajo y alto poder aglutinante.

Cuando se utiliza una suspensión de eritrocitos al 2% (v/v) y se varía únicamente la relación extracto proteico: volumen de la suspensión de eritrocitos (Sección III), se observan resultados muy similares a los discutidos anteriormente, demostrándose que las mejores condiciones para la aglutinación de eritrocitos se obtienen utilizando suspensión al 2% y una relación 1:1.

El tiempo óptimo de migración determinado con la *Dioclea lehmannii* es de 20 minutos ya que en este tiempo se logró un porcentaje alto de aglutinación (89%). Con un tiempo de migración de 15 minutos no es posible determinar el porcentaje de aglutinación debido a que los aglutinados quedan adheridos a la plastilina.

El método utilizado por Thompson et al. (1) recomienda un minuto de centrifugación para leucocitos humanos. En el caso de la aglutinación con eritrocitos utilizando *Crotalaria agatifolia*, se observó que con este tiempo de centrifugación se sedimentan rápidamente quedando unidos a la plastilina y no hay migración a lo largo del capilar. Por esta razón se disminuyó el tiempo de centrifugación a 40 segundos, obteniéndose un porcentaje de aglutinación de 31%. Como valores positivos en la determinación del porcentaje de aglutinación se toma un rango de 20-25%. Valores inferiores indican la ausencia de aglutinados o la formación muy débil de ellos.

#### *Detección de lectinas.*

Los resultados de los ensayos cuantitativos de aglutinación con eritrocitos pertenecientes a los grupos sanguíneos A<sup>+</sup>, B<sup>+</sup> y O<sup>+</sup> se presentan en la tabla II. Se comprueba la existencia de lectinas y se evalúa su capacidad eritroaglutinante, sea fuerte o débil, en los extractos salinos de *Bauhinia picta*, *Tamarindus indica* (inmaduro), *Dioclea lehmannii* y *Erythrina rubrinervia*.

T A B L A I I

Determinación por migración capilar de la aglutinación de eritrocitos humanos.

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

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

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

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

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

El método normalizado de migración capilar permite observar la presencia en la *Ormosia* spp de lectinas específicas para el grupo O<sup>+</sup>, con un bajo poder aglutinante; dicha presencia no fue posible detectarla por los métodos cualitativos en tubo de ensayo y en placa. Además se confirma la ausencia de lectinas en las especies *Abrus fruticulosus* y *Ormosia tovarensis*.

### CONCLUSIONES

La normalización del método de migración capilar para eritrocitos constituye un avance interesante en la evaluación cuantitativa de la actividad eritroaglutinante de un extracto proteico dado, por ser un método sencillo, rápido y sensible que requiere cantidades muy reducidas del material vegetal. El uso de este método nos ha permitido detectar la presencia de lectinas cuya actividad es difícilmente observable con los ensayos tradicionales.

### Agradecimientos.

Este trabajo se realizó con la colaboración del Banco de Sangre "Moris Gutt" y de los doctores Hernando García Barriga y Roberto Jaramillo del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional.

El apoyo financiero provino del Departamento de Química de la Universidad Nacional y del Programa Multinacional de Química auspiciado por la O.E.A.

## BIBLIOGRAFIA

1. THOMPSON J. S., SEVERSON C. D., LAVENDER A. R., FORLAND M., RUSSE H. P. *Transplantation*, 6, 728-735, 1968.
2. MORENO M. C., ARANGO M., *Tesis de Grado*. Departamento de Química, Universidad Nacional, 1977.
3. SAGE H. J., VÁSQUEZ J. J. *J. Biol. Chem.*, 242, 120-125, 1967.
4. STEYERMARK A. L., "Quantitative organic microanalysis" 2ª ed. New York, Academic Press, p. 205, 1961.