



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLÁN"



U N A M

ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE EL EFECTO DE LA
FITOHEMAGLUTININA PARA TIPIFICAR GRUPOS
SANGUÍNEOS EN BORREGOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
N O R M A N A V A G O M E Z

DIRECTOR DE LA TESIS :
M. V. Z. BENITO LOPEZ BAÑOS
CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fué realizado en los laboratorios de:

- Genética. Campo 1. FES-Cuautitlán donde se precisó la técnica de tipificación.
- Análisis Clínicos de la Unidad de Medicina Familiar No. 93 del I.M.S.S. donde se desarrolló el estudio.

INDICE

	PAG.
1.- Titulo	1
2.- Indice	2
3.- Resumen	4
4.- Introducción	5
5.- Material y método. ...	18
6.- Resultados	24
7.- Discusión	34
8.- Conclusiones	37
9.- Bibliografía	38

3.- Resumen.

En el presente trabajo se valora la utilidad de la Fitoheماغlutinina como ayuda para clasificar algunos grupos sanguíneos en borregos.

Se confrontaron 540 muestras de sangre ovina con extracto crudo de Phaseolus vulgaris var. Veracruz, ambos elementos diluidos 1:20 con solución salina fisiológica al 0.9 %, habiéndose obtenido tres grupos sanguíneos diferentes en base al tipo de aglutinación, dándose una clasificación arbitraria de "X", "Y" y "Z"; en donde, el grupo "X" es el más frecuente, le sigue el "Z" y por último el "Y".

Además se confrontaron los sueros con las muestras de sangre de borrego (lavadas y diluidas 1:20); encontrándose reacciones entre sueros y eritrocitos homólogos y entre no homólogos lo que nos hace suponer, que las reacciones de aglutinación encontradas con la Fitoheماغlutinina usada son diferentes a las reacciones encontradas entre sueros y eritrocitos y que por lo tanto están reguladas genéticamente por sistemas alélicos diferentes.

4.-INTRODUCCION.

a) Antecedentes.

La presencia de la Fitohemaglutinina en las semillas de muchas especies de plantas, particularmente leguminosas, ha sido conocida desde hace tiempo (23).

En el siglo pasado se obtuvo a partir de la semilla del Tártaro (Resinus comunis), una proteína que producía un efecto hemaglutinante, la que fué llamada resina [1,3,5]. Desde ese tiempo, las investigaciones sobre hemaglutinina, se ha extendido de manera que son utilizadas en diferentes ramas de la investigación; así como, en el diagnóstico de algunas anomalías cromosómicas presentes en los animales y en los humanos [9].

La Fitohemaglutinina puede ser obtenida a partir de la especie Phaseolus vulgaris (Judía roja) y de la Phaseolus comunis (Judía blanca). Sin embargo, es posible extraerla de otras variedades de la especie Phaseolus vulgaris (13,15).

La Fitohemaglutinina es una mucoproteína del grupo de las lectinas y son una clase de proteínas que poseen la capacidad de combinarse específica y reversiblemente con azúcares; así como aglutinar eritrocitos e inducir la actividad mitogénica (4). El término mucoproteína se refiere

a las proteínas combinadas con mucopolisacáridos en general (9,18).

En la actualidad se conoce que ésta mucoproteína aglutina eritrocitos de humanos de todos los grupos sanguíneos, algunas específicas, como la hemaglutinina de la haba de lima la cual fué la primera lectina que mostró particularidad de grupo sanguíneo; siendo ésta típica de los eritrocitos de sangre humana tipo A (2,8,14). Además de que aglutina sin importar el factor Rh, sexo y presencia de anticoagulantes (3,16).

Las propiedades presentes en la Fitoheamaglutinina han sido utilizadas ampliamente para el estudio de cromosomas o estudio citogenético (Cariotipo). Sin embargo, es importante hacer incapié, que las Fitoheamaglutininas no solo se utilizan para la elaboración de Cariotipos, sino que se han introducido en una amplia gama de estudios y de investigaciones tales como (2,3,4,8,14):

- a) Clasificación taxonómica de los animales.
- b) El estudio de los linfocitos defectuosos en las enfermedades.
- c) La extensa vida de los linfocitos.
- d) Defectos congénitos
- e) Estudio de la esterilidad animal.
- f) Estudios fetales intraparto.
- g) Abortos repetidos.

- h) Contribución al conocimiento de la estructura carbohidratada de la membrana de los eritrocitos.
- i) En la investigación forense de la sangre y diferenciación de sangre de un animal a otro.
- j) En la precipitación de polisacáridos y glicoproteínas específicas.
- k) Estimula la conversión de linfocitos en reposo hacia la actividad de crecimiento y división.
- l) Ciertas Fitohemaglutininas han sido utilizadas en el crecimiento de células tumorales "in-vivo" e "in-vitro".
- m) Puede ser usada como ayuda para el diagnóstico de diferentes tipos de leucemias.
- n) Se usaron cien lectinas con distintos azúcares específicos para identificar diferencias en la distribución de sacáridos sobre la superficie de la membrana de los espermatozoides, utilizando varias especies animales.
- ñ) Han sido utilizadas en la estructura y función de los sacáridos y de la superficie celular en células normales y malignas.
- o) Con la ayuda de las lectinas y diferentes azúcares específicos, fueron detectados cambios complejos en la superficie de células de la retina neural de embriones

de pollo durante su desarrollo y diferenciación.

Como se mencionó anteriormente, existen numerosas lectinas, en la mayoría de los sistemas vivientes, algunas de ellas ya han sido purificadas y poseen diferentes propiedades de acuerdo a su fuente de obtención. A continuación se describen algunas hemaglutininas que ya han sido purificadas, por ejemplo (2,20):

Concanavalina ensiformis (Frijol de jack).

Aglutinina de semilla de soya.

Aglutinina de germen de trigo.

Aglutinina de lenteja.

Aglutinina de haba de lima.

Aglutinina de frijol judía amarilla.

Aglutinina de frijol judía roja (PHA)

y otros más (2).

Concavalina A (Con A):

Es mitogénica, aglutina eritrocitos y otro tipo de células de diferentes especies animales, así como de muchos microorganismos, en particular células de levadura. Es dependiente del pH, a un pH de 5.6, Con A existe en solución como una simple especie molecular de dos protómeros con un peso molecular de 55,000 Daltons. Arriba de 5.6 la forma proteica es de un tetrámero con un peso molecular aproximado de 112,000 Daltons. A pH 7 y arriba de 7, la formación de tetrámeros va acompañada con una turbidez, indicando la for-

mación de altos agregados. La subunidad de Con A, es una proteína globular con una dimensión total de 42 x 40 x 39 Å tiene un peso molecular aproximado de 25,500 Daltons y está compuesto de 238 aminoácidos; cuatro subunidades idénticas interactúan para dar una molécula pseudotetraédricas y presenta uniones con los iones de Mn^{+2} y Ca^{+2} (2,9).

- Aglutinina de soya (SBA):

Presenta un peso molecular de 110,000 y de 120,000 Daltons por ultracentrifugación. Está constituida aparentemente por cuatro subunidades, cada una de peso molecular de 30,000 Daltons. Aglutina eritrocitos y ha sido empleada para cultivo de tejidos malignos (2,9).

- Aglutinina de germen de trigo (WGA):

Tiene un peso molecular de aproximadamente 23,000 Daltons. Presenta altos contenidos de Cistina y Glicina; se describió que es una aglutinina específica para células malignas (2,9).

- Aglutinina de lenteja:

Es mitogénica, esta constituida de dos componentes activos en forma homogénea, el peso molecular de cada una de las proteínas es de 39,000 a 48,000 Daltons, dependiendo de la técnica usada; se detectó, además, la presencia de Ca^{+2} y Mn^{+2} (2,9).

- Aglutinina de haba de lima:

Fué la primera lectina que mostró especificidad

de grupo sanguíneo, la actividad aglutinante del haba se debe a dos especies moleculares residuales (isoelectinas) cada una compuesta de los mismos aminoácidos y carbohidratos, pero con peso molecular diferente, la primera (componente II) es de 195,000 a 269,000 Daltons y el de la segunda (componente III) es de 110,000 a 138,000 Daltons. Por electroforesis ambos componentes indicaron subunidades de peso molecular de 31,000 Daltons. Ambas lectinas son glicoproteínas y contienen Mn^{+2} y Ca^{+2} . Es específica de los eritrocitos de sangre humana tipo A (2,9).

- Aglutinina de frijol judía amarilla (AX):

Tiene un peso molecular de 132,000 Daltons, contiene 10 % de carbohidratos principalmente manosa y glucosa, y de menor cantidad se encuentra la glucosamina, galactosa, arabinosa, xilosa y fructosa. También fué aislado un glicopéptido con peso molecular de 4,380 Daltons y constituido por 12 residuos de aminoácidos y 19 residuos de azúcares (2,9).

- Aglutinina de frijol, judía roja (PHA):

Fuó la primera en la que se encontró actividad mitogénica, y además, tiene actividad aglutinante, algunos investigadores han intentado separar ambas actividades pero los resultados han sido contradictorios y algunos incluso confusos. Se aislaron dos proteínas del extracto con peso molecular de 91,000 y 110,000 Daltons. Por cromatografía fueron aisladas dos fracciones:

1.- L-PHA: Es una excelente leucoaglutinante, pero posee poca actividad hemaglutinante; además, tiene propiedades mitogénicas.

2.- E-PHA: Posee una potente actividad hemaglutinante, pero poca actividad leucoaglutinante y mitogénica (2,13,20).

Fories et al. menciona que las bacterias tales como: *Escherichia coli* y *Myxococcus xanatus*, contienen una lectina de peso molecular de 30,000 Daltons; la cual tiene un ciclo biológico complejo. Por otra parte, se afirma que existen lectinas en animales, pero continúan siendo estudiadas (8).

Además existen lectinas con propiedades tóxicas, por consiguiente, es conveniente dar un breve resumen a éste respecto (21,22,23).

El efecto de las hemaglutininas tóxicas ingeridas oralmente produce trastornos de absorción intestinal en ratas, se cree que la aglutinina se combina con grupos receptores en la superficie de las células de la mucosa gástrica, o bien, ocasiona una reducción de la absorción intestinal y éstos efectos pueden explicar su acción tóxica (5,10,20).

Los signos observados, consisten en una pérdida de peso, crecimiento reducido, baja absorción intestinal de compuestos nitrogenados, bajo peso del bazo y aumento de peso del páncreas (8,21,23).

La existencia de factores tóxicos en frijoles crudos y su posible relación con las hemaglutininas de éstas semillas han sido objeto de numerosas publicaciones. La mayoría de los investigadores sostienen que las Fitohemaglutininas de éstas leguminosas tienen una acción tóxica en los animales experimentales, se publicaron datos en donde se permite una interpretación diferente (22). Por fraccionamiento en cromatografía se obtuvieron preparaciones que no tienen relación directa entre poder hemaglutinante y el tóxico lo cual, podría significar que ambas actividades se deben a factores diferentes; es decir, que deben de existir toxinas desconocidas distintas a las aglutininas. Los resultados podrían explicarse también, por la existencia de múltiples Fitohemaglutininas con distintos grados de toxicidad; o bien, a la acción combinada de varios factores (10, 21, 22).

Cabe mencionarse, que la Fitohemaglutinina de buena calidad en la actualidad solo se produce en el extranjero, en los laboratorios de U.S.A., por lo que las instituciones que necesitan el reactivo lo obtienen importándolo, por lo que consecuentemente se incrementa su valor.

En el presente trabajo se utilizó la Fitohemaglutinina cruda extraída de Phaseolus vulgaris (Frijol negro-var. Veracruz).

Por otro lado, los grupos sanguíneos en los borre-

gos están divididos en 7 grupos: A,B,C,D,R,M y X (19,22) (ver esquema 2). Y se cree, que están regulados genéticamente por 52 alelos diferentes, ésto hace que el sistema de grupos sanguíneos en borregos sea relativamente complejo; sin embargo su clasificación tiene ciertas similitudes con el de los grupos sanguíneos de los bovinos; así tenemos que, el equivalente ovino al sistema "B" de los bovinos, también se llama "B". Así mismo, el equivalente de las ovejas al sistema bovino "J", recibe el nombre de "R". Parece ser que el sistema, posee dos antígenos de grupo sanguíneo, el "R" y el "O", codificados por los alelos R y r, cuya función es regular la producción de sustancias "R" y "O"; así mismo, se ha vinculado estos dos alelos a un efecto epistático de los genes I e i; donde la presencia del genotipo ii (homocigoto recesivo) no presenta antígenos "R" ni "O" (Esquema 1) (12,18,19).

Los antígenos "R" y "O" son sustancias solubles que se encuentran libres en el suero de las ovejas con genotipos II ó Ii, y que se adsorven pasivamente por los eritrocitos (11,12,18,19).

Es importante señalar, que la clasificación sanguínea en los borregos puede hacerse en dos grupos dependiendo de la concentración baja o alta de Potasio en el plasma (18, 19). Se ha asociado ésta particularidad al sistema de grupo sanguíneo M (12,18,19). También es conveniente resaltar que

el descubrimiento de los 7 grupos señalados se hicieron por pruebas hemolíticas a excepción del grupo D, el cual se detecta por aglutinación (19).

ESQUEMA No. 1 (19).

Esta reacción se bloquea
en los animales
homocigotos para "r"

Sustancia precursora --- ↑ --- Sustancia r --- ↓ --- Sustancia B

Esta reacción se bloquea
en los animales
homocigotos para "i"

ESQUEMA No. 2

GRUPOS SANGUINEOS EN LOS ANIMALES DOMESTICOS.
Tizard 1 985 (19).

Espece	Sistemas de grupo sanguineo	Serologia
Bovinos	A, B, C, F, J, L, M, R, S, T, Z.	Hemolítico
Ovinos	A, B, C, D, M, R, X.	Hemolítico Aglutinante (Solo D)
Suinos	A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O	Aglutinante hemolítico antiglobulina
Equinos	A, C, D, K, P, Q, U.	Aglutinante hemolítico
Canino	A, B, C, D, F, J, K, L, M, N, Tr.	Aglutinante hemolítico antiglobulina
Felino	AB	Aglutinante hemolítico

B.- OBJETIVO :

**Valorar la utilidad de la Fitchemaglutinina
como ayuda para clasificar algunos grupos
sanguineos en borregos.**

C.- HIPOTESIS DE TRABAJO :

**La Fitoheماغlutinina sirve para tipificar
grupos sanguíneos en borregos.**

5.- MATERIAL Y METODO.

A) MATERIAL.

a) Material de laboratorio

Anticoagulante: Versenato de sodio al 10 %.

Solución salina fisiológica al 0.9 % (SSF).

REACTIVOS	Y	APARATOS:
NaCl al 1%		Mortero
HCl 0.1 N		Agitador magnético
NaOH 0.1 N		Centrifuga clínica
Etanol al 70 %		Termómetro

b) Material biológico.

- 540 muestras de sangre de borrego de diferentes razas, edades, sexos y manejos.
- Extracto crudo de Phaseolus vulgaris var. Veracruz (Fitoheماغلوتينina).

B) METODO.

a) Toma de muestra sanguínea y conservación

Se extrajo por punción venosa muestras de sangre (aproximadamente 8 ml.) de 15 borregos de diferentes razas, edades, sexos y manejos utilizando jeringas de 10 ml. y agujas de calibre No.20 esterilizadas, para la fase en que se determinó la técnica de trabajo. Además, se obtuvo mientras se realizaba la matanza en Rastro de Ferrería, 525 muestras de sangre ovina, que se utilizaron para desarrollar el estudio de tipificación. Cada una de éstas, se repartió en dos partes, la primera se depositó, en tubos estériles de 13 x 100 mm. (sin anticoagulante) colocandolos en la gradilla verticalmente, para que se retraiga el coágulo; y la segunda parte, se depositó en los tubos de 12 x 70 mm. (con anticoagulante en proporción de 1:5) homogenizando el contenido suavemente.

La relación de anticoagulante-muestra fué mayor que la utilizada en condiciones normales; ya que, los animales llevados a la matanza son privados de alimentos y agua; por lo que se concentra el paquete globular, y al parecer esta situación tiene el efecto de permitir la coagulación, cuando se usan concentraciones normales de anticoagulante.

La sangre se conservó a temperatura ambiente, cuando fué procesada el mismo día y en refrigeración cuando se procesó al día siguiente.

b) Análisis biológico de la muestra

El presente estudio se llevo a cabo en tres fases:

- 1.- Extracción cruda de la Fitohemaglutinina a partir de Phaseolus vulgaris var. Veracruz.
- 2.- Determinación de la técnica de trabajo.
- 3.- Desarrollo de la técnica de tipificación con el grueso de las muestras; y además, se confrontaron a la par los eritrocitos de las aglutinaciones de un grupo, con los sueros de otros grupos, en la medida en que se contó con suficiente volumen de muestra.

1.- Extracción cruda de la Fitohemaglutinina.

METODO MODIFICADO.

Se realizó un macerado del frijol negro a modo de obtener una harina, posteriormente se tamizó, a continuación se trituró con una mínima cantidad de solución salina hasta que se logró una masa homogénea (durante 2 horas aproximadamente), la masa se resuspendió con más solución salina en una proporción de 20 g de frijol con 200 ml. de solución, se ajustó después a un pH de 7.4 y agitó durante 24 horas, a una temperatura de 4 C; a continuación se centrifugó a 655 r.p.m. durante 30 min. (6); por último al sobrenadante se envasó y conservó en congelación.

2.- DETERMINACION DE LA TECNICA DE TRABAJO.

I.- Para poder establecer el método de trabajo, se obtuvo el paquete globular sin anticoagulante y sin otros posibles contaminantes, en las siguientes condiciones:

1.- Cada muestra sanguínea con anticoagulante se lavó con S.S.F., a saber:

1.1) La sangre se centrifugó a 2,500 r.p.m. durante 5 min., para posteriormente sustraer el plasma.

1.2) Una vez que se sustrajo el plasma se le agregó S.S.F. en la misma proporción del plasma sustraído.

1.3) Se resuspendió el paquete globular con la S.S.F.

1.4) Se repiten los pasos anteriores por 3 veces, hasta que se logre obtener un sobrenadante cristalino.

II.- Con la finalidad de establecer la dilución óptima de acción de los eritrocitos con la Fitoheماغlutinina; además, de que dicha acción, pueda ser apreciada macroscópicamente y ser un parámetro de diferenciación, se probaron una serie de diluciones dobles tanto de eritrocitos como de Fitoheماغlutinina, confrontándose entre sí; dando como resultado que las diluciones 1:16 y 1:32 de los dos componentes combinados e incubados a 37 ° C, durante 5 min., presentaron una mayor resolución y diferenciación. Por lo que, se decidió usar la dilución 1:20 para el desarrollo del trabajo.

3.-DESARROLLO DE LA TECNICA.

El estudio con el resto de las muestras se llevó a cabo con el mismo sistema de lavado de eritrocitos y diluciones, mencionados en el punto anterior.

La confrontación de los eritrocitos con los sueros, se realizó, con el siguiente orden:

a).- De los tres grupos de aglutinaciones obtenidas se seleccionaron las muestras con mayor volumen, con el objeto de posteriormente cruzarlas con otras.

b).- Las muestras seleccionadas junto con sus respectivos sueros, fueron procesadas con los siguientes pasos:

- Se tomó 0.1 ml. de los eritrocitos, diluidos 1:20 con 0.1 ml. de suero, en un tubo de 12 x 70 mm.
- Se incubó a 37 ° C durante 60 min.
- Se observó la aglutinación macroscópica.

De éste último punto se derivaron dos grandes grupos, ya que hubo confrontaciones en donde no se observó aglutinación, se les denominó "sueros no reactivos" ; y en las confrontaciones donde sí se observó aglutinación, se clasificaron como "sueros reactivos".

Los sueros de las muestras seleccionadas se liofilizan y conservan en congelación, para ser utilizados con otras muestras.

c1.-Análisis estadístico de la muestra.

La confrontación de los eritrocitos con los sueros reactivos y no reactivos, se analizaron bajo el método de χ^2 (chi cuadrada). Con las siguientes formulas:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E} \quad (6).$$

Donde: O= Observado
E= Esperado

Y Esperado (E) = $\frac{\text{Total de columna} \times \text{total de renglón}}{\text{Total de totales.}}$

6.- RESULTADOS.

De la confrontación del extracto crudo de Phaseolus vulgaris con los eritrocitos de ovino, se observaron tres tipo de aglutinaciones, y se les dio una clasificación arbitraria, que se muestra en el siguiente cuadro:

C U A D R O No. 1

TIPO DE AGLUTINACION	CLASIFICACION	No. DE MUESTRAS
Fina	Z	214
Moderada	Y	91
Gruesa	X	235

		540

Foto No. 1



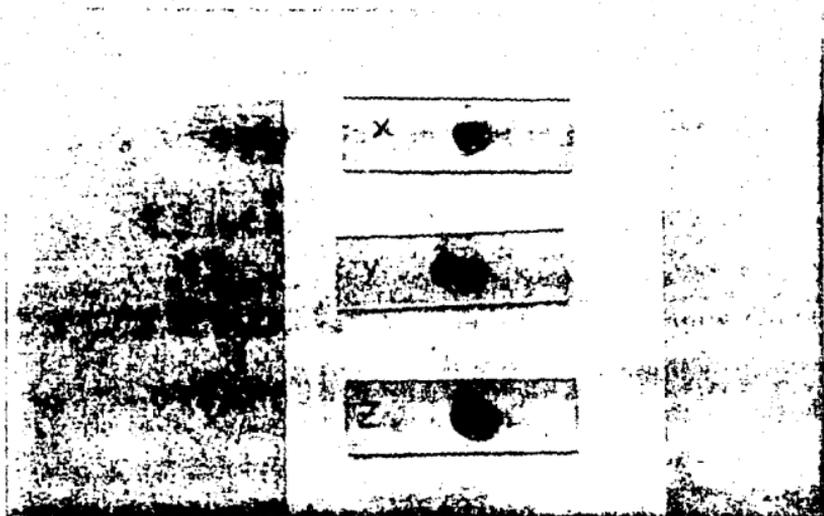
Foto No. 2



Foto No. 3



Foto No. 4



Es importante hacer notar que la clasificación arbitraria que utilizamos fué en base al tipo de aglutinación siendo: fina "Z", moderada "Y" y gruesa "X"; esto mismo podrá notarse en las fotografías 1,2,3 y 4.

Los cuadros 2 y 4, muestran los resultados de la confrontación de los eritrocitos lavados de los tres grupos y los sueros obtenidos. Así mismo, los cuadros 3 y 5 son un complemento teórico de lo que podría esperarse para desarrollar el análisis estadístico de la X^2 , bajo la hipótesis nula (H_0) en donde se plantea que las reacciones de aglutinación entre los eritrocitos y los sueros se dan fortuitamente o al azar.

H_0 : Hay independencia entre los criterios de clasificación.

H_1 : No hay independencia entre los criterios de clasificación.

Si, $X_c^2 \geq X_t^2$ se rechaza H_0

C U A D R O No. 2
 CLASIFICACION DE LA CONFRONTACION DE ERITROCITOS
 CON SUEROS REACTIVOS (Lo obtenido).

		S U E R O S			
		X	Y	Z	
E R I T R O C I T O S	X	16	29	45	= 90
	Y	40	10	40	= 90
	Z	49	36	28	= 113
		----- 105	----- 75	----- 113	----- = 293

C U A D R O No. 3

CLASIFICACION TEORICA DE LA CONFRONTACION DE ERITROCITOS
CON SUEROS REACTIVOS (Lo esperado).

		S U E R O S		
		X	Y	Z
E R I T R O C I T O S	X	32.25	23.04	34.71
	Y	32.25	23.04	34.71
	Z	40.50	28.92	43.58

De estos dos cuadros se sustituye la ecuación siguiente:

$$X^2 = \frac{(O-E)^2}{E} = \frac{(16-32.25)^2}{32.25} + \frac{(29-23.04)^2}{23.04} + \dots + \frac{(28-43.58)^2}{43.58}$$

=31.916

Por lo tanto el valor de X^2 calculada es de 31.916 mismo que puede ser comparado con X^2 teórica (alfa= 0.01, g.l.=4) = 13.277 . Lo que nos lleva a aceptar la hipótesis de que no existe independecia entre los dos criterios de clasificación para los sueros y eritrocitos reactivos.

Además se analiza por éste mismo método a los eritrocitos que no reaccionaron con los sueros, como vemos a continuación:

C U A D R O No. 4
 CLASIFICACION DE LA CONFRONTACION DE ERITROCITOS
 CON SUEROS NO REACTIVOS (Lo obtenido)

		S U E R O S				
		X	Y	Z		
E R I T R O C I T O S	X	37	17	27	=	81
	Y	18	35	20	=	73
	Z	18	18	46	=	82
		<u>73</u>	<u>70</u>	<u>93</u>		<u>236</u>

C U A D R O No. 5

CLASIFICACION TEORICA DE LA CONFRONTACION DE ERITROCITOS
CON SUEROS NO REACTIVOS (Lo esperado).

	S U E R O S		
	X	Y	Z
E R I T R O C I T O S	X 25.05	24.03	31.92
Y	22.58	21.65	28.77
Z	25.36	24.32	32.21

De los dos cuadros anteriores se sustituye la ecuación antes planteada:

$$X^2 = \frac{(0-E)^2}{E} = \frac{(37-25.05)^2}{25.05} + \frac{(17-24.03)^2}{24.03} + \dots +$$

$$\frac{(46-32.21)^2}{32.21} = 29.90$$

Por lo tanto el valor de X^2 calculada es de 29.90, mismo que puede ser comparado, también, con X^2 teórica (alfa=0.01 g.l.=4)=13.277. Lo que nos lleva a aceptar la hipótesis de que no existe independencia entre los dos criterios de clasificación para los sueros y eritrocitos no reactivos.

7.- DISCUSION.

De los resultados obtenidos en el presente estudio, específicamente en el cuadro No.1, donde se puede observar que del extracto de la Phaseolus vulgaris var. Ver. (Frijol negro) se obtuvo Fitohemaglutinina, lo que coincide con lo obtenido con Rigas y Osgood (13); además con Schwarzacher y Wolf (15), en sus trabajos con Judía roja y con Judía blanca, en donde obtuvieron Fitohemaglutinina a partir de éstas semillas.

Como podrá notarse en el cuadro No. 1 de los tres grupos de aglutinación, el grupo "X" fué el más frecuente, ya que el 43.52 % aproximadamente quedó dentro de esta clasificación; siguiéndole el grupo "Z", con un 39.63 %, siendo el grupo "Y" el menos frecuente con tan solo un 16.85 %. Estos resultados podrían explicarse de diferentes maneras, posiblemente la más viable, es la siguiente:

Considerando que los grupos sanguíneos conocidos en los ovinos son detectados por pruebas de hemólisis (A,B,C,M,R y X) y que el único grupo detectado por aglutinación (D), no ha sido relacionado a un tipo de herencia específico. La PHA empleada detecta un tipo de aglutinación diferente a los 7 descritos por Rendel (13), Stormont (18) y

Tizard(19). El cual podría estar regulado por un par de alelos con efectos codominantes, donde puede notarse que los grupos "Z" y "X" son muy cercanos en su frecuencia pero opuestos en su clasificación fenotípica; gruesa y fina respectivamente. Estas clasificaciones correspondería a los dos fenotipos homocigotos existentes en la población a la que pertenecen los animales muestreados, siendo el grupo "Y" (Aglutinación moderada) los heterocigotos, y el hecho de que no presenten una proporción 1:2:1 típica de un apareamiento al azar, se debe a la práctica de apareamiento en éstos animales ,ya que los criadores pueden favorecer más las cruzas entre grupos genéticos de su predilección, que dejarlo al azar.

Otra explicación sería, que ciertamente la clasificación encontrada en éste trabajo corresponda al grupo "D" que señala Tizard (19); sin embargo, desconocemos las condiciones bajo las cuales se obtiene este grupo. Lo que nos hace suponer que es poco probable que hablemos del mismo grupo "D". Por lo anteriormente señalado, considero conveniente se amplie este trabajo, para encontrar mayor evidencia hacia uno u otro supuesto.

Los cuadros No. 2 y 4 muestran los resultados de la confrontación entre eritrocitos lavados de los 3 grupos y los sueros obtenidos. Como podrá notarse existen eritrocitos "X" que reaccionaron con sueros "X", eritrocitos "Y" con sueros "Y", y eritrocitos "Z" con sueros "Z" y

eritrocitos que confrontaron con suero no homólogo. Estos resultados nos hace suponer que si bien, la PHA usada permite detectar tres tipos de aglutinaciones diferentes, las reacciones de aglutinación que se dan entre sueros y eritrocitos del mismo grupo, no pueden ser explicadas bajo el mismo criterio de clasificación que con la PHA empleada.

Sin embargo, el hecho de que se observe una marcada relación entre los diferentes tipos de aglutinación tanto para eritrocitos y sueros homólogos o no (X^2 significativa a un nivel $\alpha=0.01$). Nos hace suponer, que el control de estas reacciones depende del sistema de alelos D y d, pues como ya dijimos, es la única clasificación que se da por aglutinación y solo se detectaron dos tipos, los que sí reaccionan y los que no lo hacen (19).

Las fotografías 1,2,3 y 4 sirven para apoyar el criterio de clasificación de grupos sanguíneos que empleamos.

8.- CONCLUSIONES.

- La Fitoheماغlutinina extraída de la Phaseolus vulgaris var. Veracruz aglutina eritrocitos de borregos.

- La Fitoheماغlutinina usada en este trabajo detectó tres tipos diferentes de aglutinaciones en las 540 muestras de sangre de borrego estudiadas.

- Con base en la reacción de aglutinación al confrontar sueros con eritrocitos de borregos tanto homólogos o no, se deduce que los sistemas genéticos que regulan ambos tipos de reacción son diferentes.

9.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Banwel, J.G., Boldt, D.H., Mayer, J., y Weber, F.L. "Phytohemaglutining derived from red kidney bean (Phaseolus vulgaris): a cause of intestinal malabsorption associated with bacterial overgrowth in the rat". *Gastroenterology*, 84: 506, 1983.
- 2.- Barondes, S.H. "Lectins: Their multiple endogenous cellular functions", *Ann Rev. Biochem.*, 50: 207, 1981.
- 3.- Bhalla, V., Gaur, V. y Bahtia, K. "Lectin studies III. A survey of phytohemagglutinin: Interaction of lectins with erythrocytes of vertebrate species". *Vox Sang*, 35: 241, 1978.
- 4.- Howels, J. Diana. "El enigma de las Lecitinas". *Mundo Científico* 17, 22: 886, 1983.
- 5.- Curstains, Kelvin. "The human small lymphocytes: its possible pluripotential quality". *Lancet* I : 829, 1962.
- 6.- Cordova Osnaya, Lucía. "Contribución al Estudio de la Actividad Mitogénica de la Fitohemaglutinina Aislada de algunas variedades de Phaseolus vulgaris más comunes en México". Tesis de Licenciatura Q.F.B., U.N.A.M., F.E.S.-C.
- 7.- Daniel Wayne W. "Base para el Análisis de las ciencias de la salud" Editorial Limusa México 1977. pag. 325-356.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 8.- Fories, A., Wuilmare, C., Sharon, W. y Strosher, D. "Extensive - sequence Homologies among letine from legaminous plants". Bio--- chemical and Byophysical Research Comunication, 75: 980, 1977.
- 9.- Liss, H. y Sharon, N. "The biochemistry of Plants lecitins (Phytohemaglutinging)" A. NN. Rev. Ciochem. 42: 541, 1973.
- 10.- Park, N. Mataluna, A. y Araya, H. "Efectos de diversos tratami-- entos térmicos en el contenido de hemaglutininas y en la calidad protéica de 1 frijol" ARch. Lat. Nutr. 28: 184, 1978.
- 11.- Rendel, J.? Amlud, O.? Freedland, R.A., and Miller, F., 1964 -- "The relationship between the alkaline phosphathese polymorshim- and blood group O in sheep". Genetics, 59 (5): 973-986.
- 12.- Rendel, J. 1967. "Studies of blood groups and protein variants - as a means of revealing similarities and differnces between animal populations". Anim. Breed. Abst., 35: 371-383.
- 13.- Rigas, D.A., y Osgood, E.E. "Purification and properties of the phytohemaglutinging of the Phaseolus vulgaris". Journal, Biol.- Chem., 212: 607, 1965.
- 14.- Royy, S. y Bahalla, V. "Hemaglutinging and Lysis in plants and their aplication in characterising human and animal red call". Ajust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 59: (pt2), 195, 1981.
- 15.- Schwarzacher, M.G., Wolf, U. "Methods in human cytogenetics". Spring Verlag, Cap. I. pp. 21-26 1974.

- 16.- Staunton, W.E., Tood, R.W. y Melson, S.H. "Bioquímica Médica" Interamericana, ed. pp. 227 y 228, 1969.
- 17.- Stormont, C. 1965. "Mammalian immunogenetics". Genetics Today.- Proc. 11th., Int. Congr. Genetics, 3: 715-722.
- 18.- Tadashi, Kowski. "Proteínas plasmáticas" (Aplicación Clínica) -- Médica-Panamericana, Cap. 9 pp. 1, 997.
- 19.- Tizard Ian R. Inmunología Veterinaria. Ed. Interamericana 3a. Edición 1985. Cap. 21 Pag. 310-320.
- 20.- Werner, G.J. y Brucher, O. "Toxicidad especificidades y diferentes fitohemaglutininas de frijoles *Phaseolus vulgaris*. Arch. --- Lat. Nuts., 22: 267, 1972.
- 21.- Werner, G. Jaffé. "Factores tóxicos en leguminosas". Arch. Lat.- Nutr. 18: 205, 1968.
- 22.- Werner, G., Levy, A. y González, D.I., "Isolation and partial Characterization of Beans phytohemagglutinin". Phytochemistry, 13 2685-93, 1974.
- 23.- Yachin S., R. H. Svenson. "The Immunological Properties of Mitogenic Proteins Derived from *Phaseolus vulgaris*". Immunology, 22, 871, 1972.