

92-A
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



FACULTAD DE QUÍMICA
FAC. DE QUÍMICA

“ EFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS PARA LA DETERMINACION DE LECTINAS ”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
GARCIA RAMIREZ GRISELDA

FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

	PAG
I. INTRODUCCION_____	I
II. GENERALIDADES	
1.- CARACTERISTICAS GENERALES_____	2
2.- DISTRIBUCION DE LECTINAS EN PLANTAS_____	3
3.- FUNCION EN LA NATURALEZA_____	4
4.- PROPIEDADES QUIMICAS Y BIOLOGICAS_____	7
5.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION_____	8
6.- DETECCION Y ENSAYO_____	10
7.- CITOTOXICIDAD DE LECTINAS_____	11
8.- PRESENCIA DE LECTINAS EN LA DIETA HUMANA_____	13
9.- APLICACIONES_____	15
III. OBJETIVOS_____	18
IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
1.- REACTIVOS Y EQUIPO ESPECIAL_____	19
2.- MUESTRAS_____	20
3.- METODOLOGIA_____	21
4.- ANALISIS ESTADISTICO_____	26

	PAG.
V. RESULTADOS_____	30
VI. DISCUSION DE RESULTADOS_____	39
VII. CONCLUSIONES_____	44
BIBLIOGRAFIA_____	45

I. INTRODUCCION

LAS LEGUMINOSAS CONTIENEN UNA GRAN VARIEDAD DE FACTORES - TÓXICOS Y ANTINUTRICIONALES ENTRE LOS CUALES ESTÁN: INHIBIDORES - DE ENZIMAS, GLUCÓSIDOS CIANOGENICOS, FITATOS, SAPONINAS, OLIGOSACÁRIDOS PRODUCTORES DE FLATULENCIA, POLIFENOLES, ALCALOIDES Y LECTINAS.

A PESAR DE ESTO, LA POBLACION MUNDIAL LAS HA CONSUMIDO POR MILES - DE AÑOS, YA QUE EL USO DEL FUEGO POR EL HOMBRE PRIMITIVO PARA COCINAR LOS ALIMENTOS CAUSÓ UN IMPORTANTE IMPACTO EN LA PROVISION - DE MATERIAL VEGETAL COMESTIBLE, PORQUE LO HIZO DISPONIBLE PARA EL CONSUMO HUMANO Y UNA GRAN CANTIDAD DE SEMILLAS QUE ERAN TÓXICAS - EN ESTADO CRUDO LLEGARON A SER ALIMENTO DESPUÉS DEL COCIMIENTO.

LA ABUNDANCIA DE LEGUMINOSAS EN EL CONTINENTE AMERICANO Y ESPECÍFICAMENTE EN MÉXICO HACE QUE SE TRATE DE CONOCER MÁS SOBRE - SU COMPOSICIÓN Y EN ESPECIAL DE LAS LECTINAS, NOMBRE QUE PROVIENE DEL LATÍN "LEGERE" SELECCIONAR O ESCOGER DEBIDO A SU ESPECIFICI - DAD DE ACCIÓN EN GLÓBULOS ROJOS DE DIFERENTES ANIMALES, PARA ELLO SE REQUIERE CONTAR CON NUEVAS METODOLOGÍAS O MEJORAR LAS YA EXIS - TENTES PARA CARACTERIZAR MUCHAS DE ELLAS QUE SE ENCUENTRAN EN LA FLORA SILVESTRE SIN SER ESTUDIADAS.

LO ANTERIOR PERMITIRÁ LA OBTENCIÓN DE ESTOS COMPUESTOS PROTEÍNI - COS UTILIZADOS AMPLIAMENTE EN BIOQUÍMICA CLÍNICA COMO UNA HERRA - MIENTA PRINCIPALMENTE EN LOS ESTUDIOS DE GENÉTICA.

II. GENERALIDADES

1.- CARACTERISTICAS GENERALES

DURANTE LA ÚLTIMA PARTE DEL SIGLO PASADO SE CREYÓ QUE LA TOXICIDAD DE LAS SEMILLAS SE DEBÍA A TOXINAS BACTERIANAS. TEORÍA QUE FUE REFUTADA CUANDO SE DEMOSTRÓ QUE LA TOXICIDAD DE ABRUS PRECATORIUS RESIDÍA EN UNA FRACCIÓN QUE PRECIPITABA CON ALCOHOL A PARTIR DE UN EXTRACTO ACUOSO DE LA SEMILLA.

EN 1909 SE OBSERVO QUE EXTRACTOS DE SEMILLAS ERAN CAPACES DE AGLUTINAR GLOBULOS ROJOS DE VARIOS ANIMALES.

EL DESCUBRIMIENTO SOBRE EL ALTO GRADO DE ESPECIFICIDAD DE EXTRACTOS DE CIERTAS SEMILLAS HACIA LAS CÉLULAS HUMANAS CAUSÓ GRAN INTERÉS Y SE INICIÓ UNA INTENSIVA INVESTIGACIÓN SISTEMÁTICA DE MILES DE PLANTAS DE TODO EL MUNDO CON RESPECTO A SU USO POTENCIAL COMO REACTIVOS PARA TIPIFICAR LA SANGRE (LIENER, 1964).

DOS DESCUBRIMIENTOS HECHOS EN 1960 CONTRIBUYERON SIGNIFICATIVAMENTE PARA LA REALIZACIÓN DEL ENORME POTENCIAL DE LAS LECTINAS EN LA INVESTIGACIÓN BIOLÓGICA.

EL PRIMERO DE ÉSTOS FUE LA ESTIMULACIÓN MITOGENÉTICA DE LINFOCITOS CAUSADA POR FITOHEMAGLUTININAS. EL USO DE TALES CÉLULAS FACILITA GRANDEMENTE EL EXAMEN VISUAL DE CROMOSOMAS EN HUMANOS Y OTROS ANIMALES Y LLEVÓ A LA EXPANSIÓN DE LA CITOGENÉTICA HUMANA Y AL AUMENTO DEL ENTENDIMIENTO DE LAS RELACIONES CROMOSOMAS ANORMALES Y ENFERMEDAD.

LA ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS POR LECTINAS TAMBIÉN PROVEE UN INSTRUMENTO PARA EL ESTUDIO DEL MECANISMO POR EL CUAL LAS SEÑALES LLEVADAS A LA SUPERFICIE CELULAR SON TRANSMITIDAS A LA MAQUINARIA METABÓLICA DEL CITOPLASMA Y EL NÚCLEO; Y PARA EL EXAMEN DE LOS EVENTOS BIOQUÍMICOS INVOLUCRADOS EN LA CONSERVACIÓN DE UNA CÉLULA EN REPOSO O EN UNA CRECIENDO ACTIVAMENTE.

EL SEGUNDO DESCUBRIMIENTO FUE LA AGLUTINACIÓN DE CÉLULAS MALIGNAS A CONCENTRACIONES MUCHO MENORES DE LAS QUE SE REQUERÍAN PARA LA AGLUTINACIÓN DE CÉLULAS NORMALES. EN BREVE, LA CONCAVALINA A, LA AGLUTININA DE SOYA Y MUCHAS OTRAS LECTINAS MOSTRARON AGLUTINACIÓN DE CÉLULAS PREFERENCIALES. ESTO LLEVÓ AL USO DE LECTINAS PARA EL ESTUDIO DE CAMBIOS EN LA SUPERFICIE CELULAR DURANTE EL CRECIMIENTO, DIFERENCIACIÓN Y TRANSFORMACIÓN MALIGNAS.

LAS HEMAGLUTININAS SON PROTEÍNAS QUE TIENEN LA HABILIDAD DE AGLUTINAR LOS GLÓBULOS ROJOS EN FORMA SIMILAR A LOS ANTICUERPOS, PUES PRESENTAN UNA MARCADA ESPECIFICIDAD EN UNA CLASE DE ERITROCITOS Y NO EN TODOS O SOLO DEBILMENTE EN OTROS. POR LO TANTO, CADA HEMAGLUTININA ES CLARAMENTE DIFERENTE DE TODAS LAS DEMÁS Y DEBEN ESTUDIARSE INDIVIDUALMENTE. EN CONTRASTE A LOS ANTICUERPOS LOS CUALES SON SIMILARES ESTRUCTURALMENTE, LAS LECTINAS VARIAN EN COMPOSICIÓN, PESO MOLECULAR, SUBUNIDAD ESTRUCTURAL Y NÚMERO DE SITIOS RECEPTORES DE AZÚCARES.

LAS LECTINAS SE CONOCEN CON NOMBRES TRIVIALES O DE ACUERDO A SU FUENTE SEGUIDA DE SU NOMBRE COMÚN O NOMBRE BOTÁNICO (JAFFÉ, 1973).

A PESAR DE QUE LAS LECTINAS HAN SIDO ENCONTRADAS EN ANIMALES Y MICROORGANISMOS, LAS PLANTAS SON LA PRINCIPAL FUENTE DE ESTAS PROTEÍNAS. AL ESTUDIAR EXTRACTOS DE 2663 VARIETADES DE PLANTAS SE ENCONTRÓ ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN 800, TAN SOLO DE LA FAMILIA LEGUMINOSAE MÁS DE 600 ESPECIES Y VARIETADES PRESENTARON TAL ACTIVIDAD (LIS, 1981A).

2.- DISTRIBUCION DE LECTINAS EN PLANTAS

EN EL REINO VEGETAL SE HA ENCONTRADO QUE LAS LECTINAS CONSTITUYEN CERCA DEL 10% DEL NITRÓGENO TOTAL EN EXTRACTOS DE SEMILLAS MADURAS.

LA DISTRIBUCIÓN DE LAS LECTINAS HA SIDO PRINCIPALMENTE ESTUDIADA EN LEGUMINOSAS Y SE HAN ENCONTRADO EN SEMILLAS MADURAS Y ESTÁN LOCALIZADAS EN LOS COTILEDONES. SIN EMBARGO, LAS LECTINAS NO ESTÁN CONFINADAS A UNA SOLA PARTE DE LA PLANTA. LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DEBIDO A LAS LECTINAS HA SIDO DETECTADA EN LAS RAICES Y EN ALGUNOS OTROS TEJIDOS DE LAS LEGUMINOSAS, COMO EMBRIÓN Y CÁSCARA DE LA SEMILLA.

VARIOS INVESTIGADORES ENCONTRARON QUE LAS LECTINAS NO ESTABAN PRESENTES EN SEMILLAS INMADURAS PERO SI LO ESTABAN EN LAS MADURAS. EN 1976 SE ESTUDIÓ EL DESARROLLO DE LECTINAS EN CHÍCHAROS POR HEMAGLUTINACIÓN E INMUNODIFUSIÓN RADIAL Y SE ENCONTRÓ QUE ESTAS LECTINAS AUMENTABAN EN CANTIDAD PROPORCIONAL AL AUMENTO DE RESERVA TOTAL DE PROTEÍNA DE SEMILLAS MADURAS. EN 1978 USANDO UN ENSAYO RADIOINMUNOSENSITIVO NO DETECTARON LECTINAS EN SEMILLAS EN DESARROLLO DE DOLICHUS BIFLORUS DURANTE LOS PRIMEROS 26 DÍAS DESPUÉS DEL FLORECIMIENTO PERO SE ENCONTRÓ UNA APARICIÓN REPENTINA DE LECTINAS EN ALTA CONCENTRACIÓN A LOS 27 DÍAS CON UN NIVEL MÁXIMO A LOS 28 DÍAS. TODOS ESTOS ESTUDIOS INDICAN QUE LA APARICIÓN DE LECTINAS OCURRE DURANTE UN ESTADO TARDÍO DE MADURACIÓN DE LAS SEMILLAS, PREVIO A SU DESHIDRATACIÓN.

TAMBIÉN SE HA INVESTIGADO SOBRE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LECTINAS EN COTILEDONES DE SEMILLAS MADURAS Y DESPUÉS DE MUCHOS ENSAYOS SE HA LLEGADO A LA CONCLUSIÓN DE QUE LAS VACUOLAS SON LOS ORGANELOS QUE MEJOR ALMACENAN PROTEÍNAS EN VEGETALES DICOTILEDONEOS. ÉSTOS ORGANELOS ESFÉRICOS ESTÁN RODEADOS POR UNA MEMBRANA, Y VARÍA ENTRE ESPECIES, CON RESPECTO A LA HOMOGENEIDAD DE SU MATRIZ PROTEÍNICA Y LA PRESENCIA DE INCLUSIONES.

LOS ESTUDIOS ANTES MENCIONADOS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LECTINAS EN CÉLULAS DEL COTILEDÓN EN LEGUMINOSAS INDICAN QUE UNA GRAN PORCIÓN DE LECTINAS ESTÁ ASOCIADO CON LAS VACUOLAS, AUNQUE PUEDEN HABER DIFERENCIAS (EIZLER, 1986).

3.- FUNCIÓN DE LA NATURALEZA

UNA CARACTERÍSTICA ESENCIAL DE CUALQUIER MECANISMO DE DEFENSA ACTIVO DE UN SISTEMA BIOLÓGICO ES LA HABILIDAD PARA RECONOCER ESPECÍFICAMENTE EL AGENTE

TE OFENSIVO Y RESPONDER A SU PRESENCIA.

LA ESPECIFICIDAD DE LECTINAS Y LAS PROPIEDADES CONFERIDAS EN ELAS POR LA MULTIVALENCIA DE SUS SITIOS DE COMBINACIÓN LLEVÓ A INVESTIGAR LAS SIMILITUDES DE LAS LECTINAS CON LOS ANTICUERPOS Y PROPONER QUE QUIZÁ LAS LECTINAS PODÍAN FUNCIONAR COMO ANTICUERPOS VEGETALES. ACTUALMENTE SE SABE QUE HAY UNA GRAN DIFERENCIA ENTRE ESTAS DOS CLASES DE MOLÉCULAS.

SIN EMBARGO, AUNQUE LAS LECTINAS PUEDEN JUGAR UN PAPEL EN EL SISTEMA DE DEFENSA DE LAS PLANTAS, NO HAY EVIDENCIA DE LA PRESENCIA EN PLANTAS DE UN SISTEMA INMUNE DIRECTAMENTE COMPARADO CON EL SISTEMA INMUNE ANIMAL. (ETZLER, 1986).

DEBIDO A LAS CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LAS LECTINAS SE HA ESPECULADO SOBRE LA FUNCIÓN QUE JUEGAN EN LAS PLANTAS QUE LAS CONTIENEN Y SE HAN POSTULADO ALGUNAS FUNCIONES ENTRE LAS QUE TENEMOS:

- " ANTICUERPOS " CONTRA BACTERIAS.
- TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE AZÚCARES.
- CONTROL DE LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE LA SEMILLA.
- REGULACIÓN DE LA EXTENSIÓN CELULAR DE LA PLANTA.
- PROTECCIÓN CONTRA INSECTOS DEPRADADORES.
- PROTECCIÓN CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS.
- ENZIMAS.
- UNIÓN DE MICROORGANISMOS SIMBIÓTICOS NITRIFICANTES A LEGUMINOSAS.

DESAFORTUNADAMENTE NINGUNA DE LAS ANTERIORES HIPÓTESIS PROPUESTAS ESTÁ BIEN -- FUNDAMENTADA Y POR LO TANTO EL PAPEL DE LAS LECTINAS ES AÚN UNA INTERROGANTE -- ABIERTA.

EN BASE A OBSERVACIONES E INVESTIGACIONES REALIZADAS SE PROPUSO QUE -- LAS LECTINAS PUEDEN PROTEGER A LAS PLANTAS CONTRA HONGOS PATÓGENOS DURANTE LA -- IMBIBICIÓN, GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO DE LOS RETOÑOS. EN EL CASO DEL TRIGO, TAL PROPUESTA ESTÁ APOYADA POR EL DESCUBRIMIENTO DE QUE LA AGLUTININA DEL GERMEN -- DE TRIGO ESTÁ LOCALIZADA EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS QUE ES UN SITIO DE INFECCIÓN POTENCIAL. LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE LECTINAS EN MUCHAS SEMILLAS Y -- LA EVIDENCIA DE QUE CANTIDADES APRECIABLES DE LECTINAS SON LIBERADAS AL MEDIO -- AMBIENTE DURANTE LA GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS TAMBIÉN APOYA UN POSIBLE PAPEL FUNGISTÁTICO DE LAS LECTINAS.

EN 1982 SE ENCONTRARON ALTOS NIVELES DE LECTINAS PRESENTES EN CULTIVOS RESISTEN -- TES DE SEMILLAS DE SOYA AL HONGO PHYTOPHORA MEGASPERMA EN COMPARACIÓN A SEMILLAS

SUSCEPTIBLES A ESTOS HONGOS, LA LECTINA FUE LIBERADA ANTES Y EN GRAN CANTIDAD DE LAS SEMILLAS DE CULTIVOS RESISTENTES DURANTE LA IMBIBICIÓN.

TAMBIÉN SE HA PROPUESTO QUE ACTÚAN COMO DEFENSA DE PLANTAS CONTRA BACTERIAS Y VIRUS.

EN 1964 SE PROPUSO QUE LAS LECTINAS DE LEGUMINOSAS PODÍAN AYUDAR A PROTEGER LOS COTILEDONES DE LA DEGRADACIÓN POR BACTERIAS. EXTRACTOS PURIFICADOS PARCIALMENTE DE LECTINAS DE VICIA CRACCA INHIBEN EL CRECIMIENTO DE UNA BACTERIA ASOCIADA CON LA CUBIERTA DE LA SEMILLA DE ESTA PLANTA.

A CAUSA DE LA OBVIA SIMILITUD DE LOS SITIOS DE ACCIÓN DE LAS LECTINAS A LOS DE LAS GLUCOSIDASAS, ÉSTAS PODRÍAN CONSIDERARSE COMO ENZIMAS QUE HAN PERDIDO SITIOS CATALÍTICOS O, ALTERNATIVAMENTE, LAS ENZIMAS PUEDEN CONSIDERARSE LECTINAS QUE HAN ADQUIRIDO SITIOS CATALÍTICOS. TAMBIÉN ES POSIBLE QUE LECTINAS " IN SITU " POSEAN ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ALTAMENTE LÁBIL Y QUE DURANTE LA PURIFICACIÓN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LECTINA SE PIERDA; MIENTRAS QUE LA ACTIVIDAD ENLAZANTE ES RETENIDA.

OTRA ESPECULACIÓN ES QUE LA LECTINA EN SEMILLAS SECAS SON PROTEÍNAS INACTIVAS ENZIMÁTICAMENTE QUE ADQUIEREN PROPIEDADES CATALÍTICAS DURANTE LA GERMINACIÓN. LA RECIENTE DEMOSTRACIÓN DE QUE UNA LECTINA DE FRIJOL MUNG ALTAMENTE PURIFICADA ESPECÍFICA PARA GALACTOSA POSEE ACTIVIDAD DE GALACTOSIDASA Y PUEDE SERVIR COMO ESTÍMULO PARA LA BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LECTINAS Y -- ACTIVIDAD DE LECTINAS EN ENZIMAS (Lis, 1981a).

TAMBIÉN SE HA SUGERIDO QUE LAS LECTINAS PUEDEN JUGAR UN PAPEL EN EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS. LA INTERACCIÓN REVERSIBLE DE UNA LECTINA CON SU RECEPTOR: GLICOPROTEÍNA O GLICOLÍPIDO EN LA MISMA MEMBRANA, PODRÍA SER USADO POR EL ORGANISMO PARA REGULAR EL POTENCIAL DE UNIÓN A LOS CARBOHIDRATOS DE LA LECTINA DURANTE EL CICLO CELULAR O EVENTOS DE SU DESARROLLO.

DADO QUE NO HAY EVIDENCIAS DETERMINANTES PARA NINGUNA DE LAS FUNCIONES PROPUESTAS, Y YA QUE MUCHAS PLANTAS ESTÁN APARENTEMENTE LIBRES DE LECTINAS PERO QUE VIVEN Y FLORECEN, ES POSIBLE QUE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS LECTINAS, COMO SE HA OBSERVADO EN EL LABORATORIO, NO TENGAN RELACIÓN CON SU FUNCIÓN EN LA NATURALEZA (ETLER, 1986).

4.- PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

LA ÚNICA CARACTERÍSTICA COMÚN A LAS LECTINAS ES QUE TODAS SON PROTEÍNAS.

LA MAYORÍA CONTIENEN AZÚCARES (HASTA UN 50%, COMO EN LA LECTINA DE LA PAPA) UNIDOS COVALENTEMENTE Y PUEDEN ASÍ CLASIFICARSE COMO GLUCOPROTEÍNAS.

MUCHAS LECTINAS SON RELATIVAMENTE RICAS EN ÁCIDO ASPÁRTICO, SERINA Y TREONINA, HASTA UN 30% DE SU CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS Y ESTÁN CASI LIBRES DE AMINOÁCIDOS SULFURADOS A EXCEPCIÓN DE LAS AAGLUTININAS DEL GERMEN DE TRIGO Y LA PAPA QUE SON RICAS EN CISTEÍNA.

EL ALTO CONTENIDO DE ENLACES DISULFURO EN LA AGLUTININA DEL GERMEN DE TRIGO LA DOTA DE ESTABILIDAD TÉRMICA, LA PROTEGE CONTRA ENZIMAS PROTEOLÍTICAS Y CONTRA AGENTES DESNATURALIZANTES TALES COMO DETERGENTES, UREA, ÁLCALIS Y ÁCIDOS.

LAS LECTINAS DE LA PAPA Y DE DATURA STRAMONIUM SON RICAS EN HIDROXIPROLINA, UN AMINOÁCIDO QUE ESTÁ CONFINADO A UN LIMITADO NÚMERO DE PROTEÍNAS. LA LECTINA DE LA PAPA TAMBIÉN CONTIENE ORNITINA, QUE PARECE ESTAR PRESENTE EN PROTEÍNAS ARABINOGALACTANAS DE VARIAS PLANTAS PERO NO HA SIDO ENCONTRADA EN OTRAS PROTEÍNAS.

CON POCAS EXCEPCIONES, TODAS LAS LECTINAS EXAMINADAS CONTIENEN METALES Y EN ALGUNOS CASOS SE HA EVIDENCIADO LA PRESENCIA DE Mn^{++} Y/O Ca^{++} PARA LA ACTIVIDAD. EL Mn^{++} EN LECTINAS PUEDE REEMPLAZARSE POR UNA VARIEDAD DE IONES METÁLICOS SIN DISMINUIR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA COMO SE DEMOSTRÓ PARA LA CONCANAVALINA A Y PARA LA AGLUTININA DE SOYA. EL Ca^{++} EN LA CONCANAVALINA A PUEDE REEMPLAZARSE POR Cd^{++} PERO NO POR Ba^{++} .

LOS METALES CONFIEREN UN ALTO GRADO DE ESTABILIDAD ESTRUCTURAL A LA CONCANAVALINA A PROTEGIÉNDOLA CONTRA INACTIVACIÓN TÉRMICA E HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA (LIS, 1981B).

LA CONCAVALINA A A PH NEUTRO ES UN TETRÁMERO EL CUAL - ESTÁ COMPUESTO DE CUATRO SUBUNIDADES IDÉNTICAS DE PESO MOLECULAR: 26000 FORMADO POR UNA SOLA CADENA POLIPEPTÍDICA DE 237 AMINOÁCIDOS. CADA SUBUNIDAD CONTIENE DOS SITIOS DE ENLACE DE METALES UNO CON Mn^{++} Y OTRO CON Ca^{++} Y OTRO SITIO PARA UN RESIDUO DE AZÚCAR. TAMBIÉN SE HAN PRESENTADO EVIDENCIAS DE SITIOS HIDROFÓBICOS.

CONDICIONES ESTRUCTURALES ANÁLOGAS PREVALECE EN MUCHAS LECTINAS DE LEGUMINOSAS QUE CONSTAN DE DOS A CUATRO SUBUNIDADES Y CONTIENEN IONES BIVALENTES.

LAS SUBUNIDADES PUEDEN SER IDÉNTICAS Y SU DISOCIACIÓN PUEDE SER IRREVERSIBLE O REVERSIBLE DEPENDIENDO DE LAS CONDICIONES A LAS - QUE SE SOMETA (Lis, 1981; JAFFÉ, 1980; JAFFÉ, 1973).

CON RESPECTO DE SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS, PODEMOS DECIR QUE: LAS LECTINAS EJERCEN DIVERSAS ACCIONES EN LAS CÉLULAS, - DE LAS CUALES LAS MÁS ESTUDIADAS SON LA AGLUTINACIÓN Y LA ESTIMULACIÓN MITOGÉNICA. OTROS EFECTOS INCLUYEN TOXICIDAD " IN VITRO " - E " IN VIVO " E INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE HONGOS.

LOS DIFERENTES EFECTOS BIOLÓGICOS, SIN EMBARGO, NO SON EXHIBIDOS POR TODAS LAS LECTINAS.

EN SEGUIDA SE ENUMERAN ALGUNOS EFECTOS BIOLÓGICOS QUE LAS LECTINAS EJERCEN EN LAS CÉLULAS (Lis, 1981 B).

- 1.- AGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS Y OTROS TIPOS DE CÉLULAS
- 2.- ESTIMULACIÓN MITOGÉNICA DE LINFOCITOS
- 3.- GENERACIÓN DE CÉLULAS SUPRESORAS
- 4.- TOXICIDAD A CÉLULAS HUMANAS Y ANIMALES
- 5.- INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS
- 6.- INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE HONGOS
- 7.- INDUCCIÓN DE FORMACIÓN DE VACUOLAS EN MACRÓFAGOS
- 8.- EFECTOS INMUNOSUPRESIVOS " IN VIVO "

5.- AISLAMIENTO Y PURIFICACION

EL AISLAMIENTO DE LECTINAS EMPIEZA GENERALMENTE POR LA --

EXTRACCIÓN DE LA SEMILLA FINAMENTE MOLIDA CON SOLUCIÓN SALINA. SUELE REALIZARSE UNA PREEXTRACCIÓN CON SOLVENTES ORGÁNICOS PARA REMOVER LÍPIDOS Y OTRAS SUSTANCIAS QUE PUEDAN INTERFERIR EN LA PURIFICACIÓN.

EN EL PASADO SE UTILIZABA EL MÉTODO CONVENCIONAL DE --- FRACCIONAMIENTO PROTÉICO. EN EL PRESENTE, LA MAYORÍA DE LOS MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LECTINAS EMPLEAN CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD BASADA EN LA HABILIDAD DE LAS LECTINAS PARA UNIRSE A SACÁRIDOS DE MANERA REVERSIBLE, CON LA DESVENTAJA DE QUE LAS LECTINAS PUEDEN CONTAMINARSE CON GLUCOSIDASAS QUE FRECUENTEMENTE ESTÁN PRESENTES EN LOS EXTRACTOS VEGETALES (Lis, 1981 A).

LA PURIFICACIÓN DE LECTINAS PRESENTA PROBLEMAS QUE NO SON COMUNES EN LA PURIFICACIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS. LAS LECTINAS PUEDEN APARECER EN FORMAS MÚLTIPLES QUE TIENEN MÁS O MENOS SIMILAR ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y DIFIEREN LIGERAMENTE EN SUS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

MUCHAS LECTINAS ESTÁN COMPUESTAS DE SUBUNIDADES LAS CUALES PUEDEN SUFRIR REACCIONES DE ASOCIACIÓN-DISOCIACIÓN.

EL COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO Y OTRAS CARACTERÍSTICAS DE -- LAS LECTINAS PUEDEN DEPENDER DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES ESPECIALMENTE DE LA PRESENCIA DE IONES METÁLICOS.

POR LO TANTO, LOS RESULTADOS DE LABORATORIOS DIFERENTES SON DIFÍCILES DE COMPARAR PORQUE NO PUEDE DETERMINARSE SI LAS DIFERENCIAS EN LAS PROPIEDADES DESCRITAS SON DEBIDAS AL HECHO DE QUE SE OBTUVIERON DIFERENTES FRACCIONES O QUE LAS FRACCIONES HOMÓLOGAS DE VARIAS SEMILLAS TIENEN DIFERENTES PROPIEDADES.

LA AFINIDAD ESPECÍFICA POR CIERTOS RESIDUOS DE AZÚCAR PUEDE USARSE PARA LA PURIFICACION DE LECTINAS. FRECUENTEMENTE PUEDEN OBTENERSE EN UN SOLO PASO EN FORMA RELATIVAMENTE PURA Y CON EXCELENTE RENDIMIENTO POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

LA VENTAJA QUE PUEDE TOMARSE DEL HECHO DE QUE LA MAYORÍA DE LAS LECTINAS SON GLUCOPROTEÍNAS ES QUE PUEDEN INTERACTUAR

CON OTRAS LECTINAS. ASÍ LA CONCAVALINA A UNIDA COVALENTEMENTE A LA SEPHAROSA PUEDE USARSE PARA AISLAR LECTINAS DE DIFERENTES - EXTRACTOS VEGETALES CRUDOS (JAFFÉ, 1980; LIS, 1981A; JAFFÉ, -- 1973).

6.- DETECCION Y ENSAYO

COMO LO INDICA SU NOMBRE, LAS HEMAGLUTININAS SE DETEC-- TAN Y CARACTERIZAN POR SU ACCIÓN SOBRE LOS GLÓBULOS ROJOS Y ES LA AGLUTINACIÓN LA MANIFESTACIÓN MÁS ESTUDIADA DE LA INTERAC--- CIÓN DE UNA LECTINA CON CÉLULAS, CARACTERÍSTICA QUE LAS DISTIN-- GUE DE OTRAS MACROMOLÉCULAS ENLAZANTES DE AZÚCARES TALES COMO - GLUCOSIDASAS Y GLUCOSILTRANSFERASAS.

PARA QUE LA AGLUTINACIÓN SE LLEVE A CABO LA LECTINA DE-- BE UNIRSE A LA CÉLULA, SIN EMBARGO NO HAY UNA RELACIÓN SIMPLE - ENTRE EL NÚMERO DE ENLACES DE LECTINAS Y AGLUTINACIÓN. SE CONO-- CEN CASOS EN DONDE CANTIDADES CONSIDERABLES DE UNA LECTINA SE - UNEN A CÉLULAS SIN CAUSAR AGLUTINACIÓN. ÉSTO ES POR QUE LA AGLUTI-- NACIÓN ES AFECTADA POR MUCHOS FACTORES TALES COMO LAS PROPIEDA-- DES MOLECULARES DE LA LECTINA (NÚMERO DE SITIOS DE ENLACE, PE-- SO MOLECULAR), PROPIEDADES DE LA SUPERFICIE CELULAR (NÚMERO Y ACCESIBILIDAD DE LOS SITIOS RECEPTORES, FLUIDEZ DE MEMBRANA) Y ESTADO METABÓLICO DE LAS CÉLULAS. LA RELATIVA CONTRIBUCIÓN DE - LOS DIFERENTES FACTORES DEPENDE DE LAS LECTINAS Y DE LAS CÉLU-- LAS EXAMINADAS. ADEMÁS LA AGLUTINACIÓN ES AFECTADA POR LAS CON-- DICIONES EXTERNAS DEL ENSAYO TALES COMO TEMPERATURA, CONCENTRA-- CIÓN CELULAR, MEZCLADO, ETC. (LIS, 1981 B).

LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LAS LECTINAS SE MIDE GENE-- RALMENTE MEDIANTE UNA TÉCNICA DE DILUCIÓN SERIADA CON ESTIMACIÓN VISUAL DEL PUNTO FINAL. LA TÉCNICA DE MICROTITULACIÓN HA ENCON-- TRADO AMPLIA ACEPTACIÓN, YA QUE UTILIZA UNA MÍNIMA CANTIDAD DE MUESTRA Y POR LA RAPIDEZ CON QUE SE REALIZA LA DETERMINACIÓN.

SE REQUIERE DE LA PRESENCIA DE NaCl U OTRAS SALES PARA LA AGLUTINACIÓN. LOS GLÓBULOS ROJOS LAVADOS DEBEN ACTIVARSE CON UNA -- PROTEASA COMO PAPAÍNA, PRONASA O TRIPSINA (JAFFÉ, 1980).

LIENER PROPUSO UN MÉTODO CUANTITATIVO QUE SE BASA EN LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN DE LOS ERITROCITOS POR EFECTO DE LA CANTIDAD DE HEMAGLUTININAS PRESENTES (LIENER, 1955).

UN NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE LECTINAS -- LLAMADO ELECTROFORESIS POR AFINIDAD SE HA DESARROLLADO, EN EL -- CUAL SE COMBINAN LOS PRINCIPIOS DE CROMATOGRAFÍA Y ELECTROFORE-- SIS (Lis, 1981 a).

7.- CITOTOXICIDAD DE LECTINAS

EN EXPERIMENTOS REALIZADOS POR INVESTIGADORES DETECTA-- RON QUE CON EL USO DE GLÓBULOS ROJOS DE DIFERENTES ANIMALES SE LOGRA DISTINGUIR CUATRO TIPOS DE ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE EN -- LOS EXTRACTOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE FRIJOLAS: AQUELLOS -- QUE AGLUTINAN ERITROCITOS TRIPSINIZADOS DE CONEJO Y DE VACA LLAMADOS TIPO A, LOS QUE AGLUTINAN SOLO GLÓBULOS DE CONEJO LLAMADOS TIPO B, LOS QUE AGLUTINAN SOLO GLÓBULOS DE VACA LLAMADOS TIPO C Y LOS QUE NO ACTÚAN SOBRE NINGUNO DE LOS DOS TIPOS DE GLÓBULOS LLAMADOS TIPO D. SE DETECTÓ TAMBIÉN QUE LOS TIPOS A Y C -- SON TÓXICOS CUANDO SE ADICIONAN A LA DIETA DE ANIMALES EXPERI-- MENTALES (JAFFÉ, 1972).

LAS LECTINAS TÓXICAS GENERALMENTE SON SELECTIVAS EN SU ACCIÓN EN CÉLULAS. EN PARTICULAR, LAS CÉLULAS TRANSFORMADAS SON FRECUENTEMENTE MUCHO MÁS SENSIBLES A LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE LAS LECTINAS QUE LAS CÉLULAS NORMALES.

TAMBIÉN SE HA OBSERVADO QUE LAS LECTINAS (ESPECIALMEN-- TE LA CONCAVALINA A) INHIBEN EL CRECIMIENTO DE TUMORES; PERO

POR DESGRACIA, A LA CONCENTRACIÓN DE CONCAVALINA A REQUERIDA - PARA LA SUPRESIÓN DEL TUMOR DICHA DOSIS ES TÓXICA. RECIENTEMENTE SE HAN REALIZADO EXPERIMENTOS DEL USO TERAPÉUTICO DE LA LECTINA DEL RICINIUS COMMUNIS CON PACIENTES DE CÁNCER QUE HAN DADO RESULTADOS ALENTADORES (LIS, 1981 A).

LA TOXICIDAD DE LAS LECTINAS TAMBIÉN DEPENDE DE LA ESPECIE ANIMAL Y DE LA RAZA ESPECIAL QUE SE EMPLEE. POR EJEMPLO, LA SOYA CRUDA PUEDE CAUSAR LA MUERTE DE CERDOS DE GUINEA PERO NO LA DE RATAS. DIFERENTES RAZAS DE RATONES PRESENTAN DIFERENTES VELOCIDADES DE MORTALIDAD CUANDO SE INYECTAN CON UN EXTRACTO DE FRIJÓLES CRUDOS. EN 1962 SE OBSERVÓ QUE LA LECTINA DE LAS JUDÍAS INHIBE EL CRECIMIENTO Y CAUSA LA MUERTE DE RATAS CUANDO SE ADMINISTRA AL 0.5% EN LA DIETA. EN 1963, EN UN EXPERIMENTO SIMILAR CON POLLOS SE OBSERVÓ QUE LA DISMINUCIÓN EN EL CRECIMIENTO FUE MUCHO MENOR QUE EN LAS RATAS Y NO HUBO ACCIÓN LETAL.

SE HA OBSERVADO QUE LAS LECTINAS DE FRIJOL ADMINISTRADAS POR VÍA ORAL A RATAS REDUCEN LA ABSORCIÓN DE TODOS LOS NUTRIENTES. EXPERIMENTOS " IN VITRO " CON ASAS INTESTINALES TOMADAS DE RATAS ALIMENTADAS CON LECTINAS REVELÓ UNA IMPORTANTE DISMINUCIÓN EN LA ABSORCIÓN DE GLUCOSA A TRAVÉS DE LA PARED INTESTINAL EN COMPARACIÓN A LOS CONTROLES (JAFFÉ, 1980).

PUEDE CONCLUIRSE QUE LA ACCIÓN DE LA LECTINA ES DEBIDO A QUE ÉSTAS SE COMBINAN CON LOS AZÚCARES DE LA MEMBRANA DE LA MUCOSA INTESTINAL, CAUSANDO INTERFERENCIA NO ESPECÍFICA DE LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES. EN 1974 SE APOYO ESTA HIPÓTESIS AL ENCONTRAR QUE UN NÚMERO DE DIFERENTES LECTINAS REACCIONABAN CON FOLÍCULOS Y VELLOSIDADES DEL INTESTINO PERO A DIFERENTES REGIONES DE ÉSTE, DEPENDIENDO DE LA ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA.

ÁSIMISMO, SE PROPUSO QUE LA TOXICIDAD DE LA LECTINA DEL FRIJOL PODÍA SER ATRIBUÍDA A SU HABILIDAD DE UNIRSE A SITIOS RECEPTORES ESPECÍFICOS EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS DE LA PARED INTESTINAL.

LA APARICIÓN DE LESIONES Y RUPTURAS EN EL DESARROLLO DE LAS VELLOSIDADES ACOMPAÑA A LA UNIÓN DE LA LECTINA DEL FRIJOL COMÚN CON LA CÉLULA.

LA HABILIDAD DE LA LECTINA PARA DISMINUIR LA CAPACIDAD ABSORBENTE DEL INTESTINO DELGADO NO ESTÁ CONFINADA A LOS AZÚCARES. POR EJEMPLO, LA LECTINA PURIFICADA DE CHÍCHARO DISMINUYE LA ABSORCIÓN DUODENAL DE HISTIDINA EN RATONES. Y LA ADICIÓN DE LECTINA DE FRIJOL COMÚN A UNA DIETA DE CASEÍNA PARA RATAS PROVOCÓ UNA MALA ABSORCIÓN DE LÍPIDOS, NITRÓGENO Y VITAMINA B₁₂ ASÍ COMO UNA INTERFERENCIA EN EL TRANSPORTE DE IONES.

PARECERÍA QUE LOS EFECTOS DE LA LECTINA EN LA HABILIDAD ABSORBENTE DEL INTESTINO DELGADO ES MÁS QUE UNA CONSECUENCIA EN LOS CAMBIOS DE PERMEABILIDAD INTESTINAL. EN 1984 SE ENCONTRÓ QUE LA INTRODUCCIÓN DE LECTINA DE GERME DE TRIGO EN EL INTESTINO DELGADO DE LAS RATAS DISMINUÍA LA PERMEABILIDAD DE PEQUEÑAS MOLÉCULAS DE POLIETILENGLICOL (P.M. 600), PERO AUMENTABA LA PERMEABILIDAD DE GRANDES MOLÉCULAS DE DEXTRAN (P.M. 3000), MIENTRAS QUE CON LA CONCAVALINA A PRESENTABA UN EFECTO CONTRARIO. ESTOS DESCUBRIMIENTOS PUEDEN TENER IMPORTANTES IMPLICACIONES CON RESPECTO A REACCIONES ALÉRGICAS A ALIMENTOS QUE CONTIENEN LECTINAS. ÉSTA INTERFERENCIA NO ESPECÍFICA CON LA ABSORCIÓN DE NUTRIENTES ES SIN DUDA UNA DE LAS RAZONES DE QUE LAS PROTEÍNAS DE LEGUMINOSAS SEAN POBREMENTE UTILIZADAS, O SEA, QUE PRESENTEN UNA BAJA DIGESTIBILIDAD (LIENER, 1986; HARA, 1986).

8.- PRESENCIA DE LECTINAS EN LA DIETA HUMANA

EL HECHO DE QUE LAS LECTINAS ESTÉN AMPLIAMENTE DISTRIBUIDAS EN LOS ALIMENTOS COMUNMENTE CONSUMIDOS POR HUMANOS SURGE LA PREGUNTA IMPORTANTE SI ELLO POSEE UN RIESGO SIGNIFICANTE PARA LA SALUD DE LOS MISMOS.

A PESAR DE QUE LAS LECTINAS EN LA MAYORÍA DE LAS PLANTAS COMESTIBLES SON INACTIVADAS POR TRATAMIENTOS TÉRMICOS, LA POSIBILIDAD DE EFECTOS TÓXICOS PRODUCIDOS POR CONSUMIR ESTOS ALIMENTOS CRUDOS O EN ESTADO INADECUADO DE COCIMIENTO ES REAL.

LAS LECTINAS TAMBIÉN HAN SIDO DETECTADAS EN ALIMENTOS -- QUE HAN ESTADO SUJETOS A ALGÚN PROCESO, TALES COMO CEREALES SECCOS Y CACAHUATES, GERME DE TRIGO Y FRIJOLES SECOS.

TAMBIÉN SE DEBE CONSIDERAR EL HECHO DE QUE LAS LECTINAS ENCONTRADAS EN MUCHAS LEGUMINOSAS, GERME DE TRIGO Y TOMATES, -- SON RESISTENTES A LA ACCIÓN DE ENZIMAS DIGESTIVAS.

EXISTEN VARIOS REPORTES EN LA LITERATURA DE CASOS DE HUMANOS INTOXICADOS EN LOS CUALES LAS LECTINAS PARECEN HABER SIDO LOS AGENTES CAUSANTES. EN 1929 SE DESCUBRIERON DOS CASOS DE ENVENENAMIENTO EN NIÑOS QUE HABÍAN CONSUMIDO FRIJOLES CRUDOS (P. COCCINEUS). ASIMISMO EN 1964, FUERON DESCRITOS ALGUNOS CASOS DE NIÑOS QUE HABÍAN ENFERMADO DE UNA MANERA EXTREMA DESPUÉS DE LA INGESTIÓN DE BAYAS (DE PHYTOLACCA AMERICANA) O EXPOSICIONES -- SISTEMÁTICAS DE SU JUGO EN LA MANO. UN EXÁMEN DE LA SANGRE REVELÓ UN MARCADO AUMENTO DE LINFOCITOS PLASMACITOIDES Y DE HECHO ESTA OBSERVACIÓN LLEVÓ A DESCUBRIR EL AHORA BIEN CONOCIDO EFECTO MITOGÉNICO DE LAS LECTINAS.

EN 1948 SE PRESENTÓ UNA EPIDEMIA DE GASTROENTERITIS ENTRE LA POBLACIÓN DE BERLÍN ORIENTAL DEBIDO AL CONSUMO DE FRIJOLES PARCIALMENTE COCIDOS, QUE HABÍAN SIDO DISTRIBUIDOS EN LA CIUDAD DURANTE SU BLOQUEO. EN TANZANIA SE DETERMINÓ QUE UNA MEZCLA DE MAÍZ Y FRIJOLES QUE HABÍAN RECIBIDO COCIMIENTO INSUFICIENTE -- ERA POTENCIALMENTE NOCIVA PARA LOS INFANTES A LOS QUE SE HABÍA DESTINADO. ESTE PROBLEMA SURGIÓ DEL HECHO DE QUE UN COCIMIENTO INADECUADO ES FRECUENTEMENTE EN LOZA DE BARRO SOBRE UN FUEGO DE LEÑA, SE FORME UNA MASA VISCOSA Y GRUESA COMO LOS FRIJOLES Y EL MAÍZ Y POR LO CUAL EL CALOR PUEDE SER INEFICIENTE, PUES EN AUSENCIA DE UN CONSTANTE Y VIGOROSO MOVIMIENTO GRANDES CANTIDADES DE LECTINAS PUEDEN ESCAPAR DE SER DESTRUIDAS.

UNA DISMINUCIÓN EN EL PUNTO DE EBULLICIÓN DEL AGUA, TAL COMO SUCEDE EN CIERTAS REGIONES MONTAÑOSAS DEL MUNDO, PUEDE TAMBIÉN RESULTAR EN LA INCOMPLETA DESTRUCCIÓN DE LA LECTINA.

UNA MÁS RECIENTE APARICIÓN DE INTOXICACIÓN EN INGLATERRA HA SIDO DESCRITA Y SIRVIÓ PARA ENFATIZAR EL RIESGO ASOCIADO A LOS FRIJOLES CRUDOS O INADECUADAMENTE COCIDOS. EN 1976 NIÑOS ESCOLARES EN UN DÍA FESTIVO COMIERON FRIJOLES QUE HABÍAN SIDO REMOJADOS EN AGUA PERO NO ESTABAN COCIDOS. LOS NUEVE NIÑOS QUE COMIERON LOS FRIJOLES COMENZARON CON AGUDAS NÁUSEAS Y EN EL LAPSO DE HORA A HORA Y MEDIA EMPEZARON A VOMITAR SEGUIDO DE DIARREA. - TAN POCOS COMO 4 O 5 FRIJOLES FUERON SUFICIENTES PARA PRODUCIR - ESTAS REACCIONES (LIENER, 1986; BENDER, 1983).

TODAS LAS LECTINAS TÓXICAS PRODUCEN TRANSTORNOS PARECIDOS, DE MAYOR O MENOR GRAVEDAD, ENTRE LOS QUE RESALTA EN PRIMER LUGAR LA INTENSA INFLAMACIÓN DE LA MUCOSA INTESTINAL, CON LA POSTERIOR DESTRUCCIÓN DE LOS EPITELIOS, EDEMA Y HEMORRAGIA DEL TEJIDO LINFÁTICO. EN EL HÍGADO SE OBSERVA DEGENERACIÓN GRASA Y NECROSIS. TAMBIÉN EL MIOCARDIO SUFRE ALTERACIONES DEGENERATIVAS. EN LOS CAPILARES DILATADOS DE TODOS LOS ÓRGANOS SE PUEDEN OBSERVAR TROMBOS (LINDNER 1978).

9.- APLICACIONES

LA PRIMERA APLICACIÓN DE LAS LECTINAS FUE EN LAS INVESTIGACIONES DE INMUNOLOGÍA. CON EL PASO DEL TIEMPO SE FUE AMPLIANDO SU USO EN MUCHAS OTRAS ÁREAS DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA ASÍ COMO EN LA MEDICINA CLÍNICA.

- AISLAMIENTO DE GLICOPROTEÍNAS Y GLICOPÉPTIDOS.

A CAUSA DE LA ANALOGÍA DE LAS INTERACCIONES LECTINA-SACÁRIDOS A LAS REACCIONES ANTICUERPOS-ANTÍGENOS, LA APLICACIÓN DE LAS LEC-

TINAS, YA SEA EN SOLUCIÓN O MÁS FRECUENTEMENTE INMOVILIZADAS, PARA LA PURIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS Y GLICOPÉPTIDOS FUE UNA EXTENSIÓN NATURAL DEL USO DE ANTÍGENOS PARA EL AISLAMIENTO DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS. AUNQUE LA ESPECIFICIDAD DE LAS LECTINAS ESTÁ CONFINADA A AZÚCARES, SU APLICACIÓN TIENE MUCHAS VENTAJAS. PRIMERO, LAS LECTINAS SON FACILMENTE PURIFICADAS EN GRANDES CANTIDADES; SEGUNDO, LAS GLICOPROTEÍNAS O GLICOPÉPTIDOS PRECIPITADOS O ABSORBIDOS ESPECÍFICAMENTE PUEDEN ELUIRSE FRECUENTEMENTE CON MONOSACÁRIDOS DISPONIBLES; TERCERO, LA ELUCIÓN PUEDE LLEVARSE A CABO A PH NEUTRO O CERCA DEL NEUTRO CON MÍNIMO EFECTO DETERIORANTE DE LA GLICOPROTEÍNA. SIN EMBARGO, EN ALGUNOS CASOS PUEDE PRESENTARSE LA ADSORCIÓN NO ESPECÍFICA (HIDROFÓBICA O IÓNICA) DE LAS LECTINAS.

SE HA EMPLEADO CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN LA PURIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNAS SOLUBLES O GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA.

- AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS GLICOSILADOS.

UNA INTERESANTE APLICACIÓN DE LAS LECTINAS HA SIDO EL AISLAMIENTO DE TRNA, CONTENIENDO BASES GLICOSILADAS.

ENTRE OTRAS APLICACIONES ESTÁ EL ESTUDIO ESTRUCTURAL DE CARBOHIDRATOS, CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE CELULAR Y SEPARACIÓN CELULAR.

LA AGLUTINACIÓN CON LECTINAS ES TAMBIÉN DE USO EN EL SEGUIMIENTO DE CAMBIOS EN LA SUPERFICIE CELULAR DURANTE PROCESOS FISIOLÓGICOS Y PATOLÓGICOS. MUY IMPORTANTE ES LA AGLUTINACIÓN SELECTIVA DE UNA POBLACIÓN PARTICULAR DE CÉLULAS EN UNA PREPARACIÓN CELULAR HETEROGÉNEA PORQUE PROVEE UN MEDIO SIMPLE Y EFICIENTE PARA EL FRACCIONAMIENTO CELULAR.

- Usos CLÍNICOS.

LAS LECTINAS MITOGENICAS HAN SIDO EMPLEADAS EN MEDICINA CLÍNICA PARA RECONOCER DEFICIENCIAS INMUNOLÓGICAS ADQUIRIDAS Y CONGÉNITAS, PARA DETECTAR SENSIBILIZACIÓN CAUSADA POR ENFERMEDADES INFECCIOSAS,

PARA MONITOREAR LOS EFECTOS DE VARIAS MANIPULACIONES INMUNOSUPRESIVAS E INMUNOTERAPÉUTICAS Y EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES - GENÉTICAS CON DEFECTOS CROMOSOMALES.

EN BANCOS DE SANGRE LAS LECTINAS SON USADAS PARA DETECTAR E IDENTIFICAR LOS TIPOS Y SUBTIPOS DE SANGRE (Lis, 1981 A),

III. OBJETIVOS

- 1.- CARACTERIZAR LAS LECTINAS PRESENTES EN LAS LEGUMINOSAS ESTUDIADAS EN BASE A SU ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE SOBRE ERITROCITOS DE CUATRO DIFERENTES ESPECIES.
- 2.- CONFIRMAR LA ALTA SENSIBILIDAD DE LOS ERITROCITOS DE HAMSTER, PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE LECTINAS EN EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS.
- 3.- OBSERVAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS DE LEGUMINOSAS EN LA DETERMINACIÓN DE LECTINAS, PARA VER LA POSIBILIDAD DE REDUCIR LA CANTIDAD DE MUESTRA CON EL FIN DE FACILITAR SU PREPARACIÓN Y OBTENER UNA MEJOR REPRODUCTIBILIDAD.

IV. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

EN EL PRESENTE EXPERIMENTO SE EMPLEÓ EL MÉTODO DE MICROTI TULACIÓN DESCRITO POR JAFFÉ (1974). EL CUAL SE BASA EN LA DETE CIÓN SEMICUANTITATIVA DE HEMAGLUTININAS O LECTINAS EN EXTRACTOS VEGETALES POR MEDIO DE DILUCIONES SERIADAS EN DONDE SE DETERMINA EL PUNTO FINAL POR UNA ESTIMACIÓN VISUAL DE LA AGLUTINACIÓN DE E RITROCITOS EN ESTUDIO, QUE DEBEN SER LAVADOS Y SENSIBILIZADOS POR UNA PROTEASA (PRONASA, TRIPSINA O PAPAÍNA) YA QUE LA REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN SE MEJORA CONSIDERABLEMENTE CON ESTE TRATAMIENTO.

1.- REACTIVOS Y EQUIPO ESPECIAL.

- SANGRE DE HUMANO TIPO A.
- SANGRE DE CONEJO (PROPORCIONADA EN EL BIOTERIO DE LA FACUL TAD DE QUÍMICA, UNAM).
- SANGRE DE HAMSTER (PROPORCIONADA EN EL BIOTERIO DE LA FACUL TAD DE QUÍMICA, UNAM).
- SANGRE DE VACA (PROPORCIONADA EN LA FACULTAD DE MEDICINA VE TERINARIA, UNAM).
- SOLUCIÓN ISOTÓNICA (0.85% DE NaCl).
- SOLUCIÓN DE NaCl AL 1%.
- TRIPSINA. ACTIVIDAD: UNA PARTE DE TRIPSINA CONVIERTE 250 PAR TES DE CASEINA A PROTEASAS, PEPTONAS Y AMINOÁCIDOS (ENSAYO - U.S.P.)
- PRONASA (PURIFICADA) TIPO V PROTEASA DE STREPTOMYCES GRI--- SEUS, 0.7-1.0 U/MG DE PESO SÓLIDO DILUIDA CON ALMIDÓN.
- SOLUCIÓN ANTICOAGULANTE DE CITRATO DE SODIO.
- SOLUCIÓN ANTICOAGULANTE ALSEVER CUYA COMPOSICIÓN ES LA SIGUIEN TE:

GLUCOSA _____ 0.6833 g.
 CITRATO SÓDICO _____ 0.8080 g.
 ACIDO CÍTRICO _____ 0.0550 g.
 NACI _____ 0.4200 g.
 AGUA DESTILADA (CBP) _____ 100 ML.

- ESPECTROFOTÓMETRO COLEMAN JUNIOR II A
- ADAPTADOR PARA CELDAS DE 10 x 75 MM (ACONDICIONADO A UNA ABERTURA DE 1 CM²).
- MICROTITER KIT (COOK ENG-ALEXANDER VIRGINIA USA).

2.- MUESTRAS

LAS SEMILLAS ESTUDIADAS EN ESTE EXPERIMENTO FUERON ELEGIDAS AL AZAR; TRES MUESTRAS TÓXICAS EN SU ESTADO CRUDO Y TRES NO TÓXICAS EN FORMA CRUDA, LAS CUALES SE ENLISTAN EN EL SIGUIENTE CUADRO.

CUADRO No. 1

NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	LUGAR DE ORIGEN
<u>Semillas tóxicas en forma cruda</u>		
Frijol negro jamapa (Sep.1987)	Phaseolus vulgaris variedad de alto rendimiento	I.N.I.A., Chapingo, Texcoco, Edo. de Méx.
Alverjón (Nov.1975) Jock Bean, Haba Blanca	Canavalia ensiformis cultivo 8000Kg./ha	San Andrés Tuxtla, Veracruz.
Frijol del monte	Phaseolus lunatus variedad silvestre	Sinaloa.
<u>Semillas no tóxicas en forma cruda</u>		
Lenteja	Lens culinaris	Mercado local, D. F.
Chichoro	Pisum sativum	Mercado local, D. F.
Haba	Vicia faba	Mercado local, D. F.

UNA VEZ OBTENIDAS LAS SEMILLAS SE LIMPIARON Y MOLIERON - PARA TENERLAS EN FORMA DE HARINA, CUYO TAMAÑO DE PARTÍCULA FUERA DE APROXIMADAMENTE 1 MM DE DIÁMETRO, EQUIVALENTE A PASAR POR LA MALLA # 20. ES IMPORTANTE MENCIONAR QUE SE TUVO LA PRECAUCIÓN DE UTILIZAR UN MOLINO DE CUCHILLAS (MARCA ARTHUR H. THOMAS COMPANY PHILADELPHIA, P.A., USA; THOMAS WILEY MODELO 4) CON EL FIN DE EVITAR EL SOBRECIENTAMIENTO DEL MATERIAL DURANTE LA MOLIENDA.

3.- METODOLOGIA

LA SOLUCIÓN SALINA DE NaCl AL 1% ÚNICAMENTE SE UTILIZA - PARA PREPARAR LOS EXTRACTOS, MIENTRAS QUE LA SOLUCIÓN ISOTÓNICA - (NaCl AL 0.85%) ES EMPLEADA EN LA PREPARACIÓN DE LA SANGRE Y - EN LA MICROTITULACIÓN.

PREPARACION DEL EXTRACTO. SUSPENDER UN GRAMO DE MUESTRA FINAMENTE MOLIDA EN 10 ML DE SOLUCIÓN DE NaCl AL 1%, AGITAR MECANICAMENTE DURANTE DOS HORAS A 300 RPM A TEMPERATURA AMBIENTE. DESPUÉS - DE ESTE TIEMPO CENTRIFUGAR EL EXTRACTO A 1200 RPM DURANTE 10 MINUTOS, FILTRAR EL SOBRENADANTE Y AFORAR A 10 ML CON SOLUCIÓN DE - NaCl AL 1%.

PREPARACION DE LA SANGRE. RECIBIR LA SANGRE EN SOLUCIÓN ANTICOAGULANTE Y CENTRIFUGAR DE 10 A 15 MINUTOS PARA OBTENER SOLAMENTE - LOS ERITROCITOS, LOS CUALES SE LAVAN TRES VECES CON SOLUCIÓN ISOTÓNICA. DESPUÉS DE LA TERCERA LAVADA, DILUIR EL PAQUETE DE GLOBULOS ROJOS AL 4% PARA LO QUE SE ADICIONAN 24 ML DE SOLUCIÓN ISOTÓNICA POR CADA ML DEL PAQUETE DE ERITROCITOS.

POSTERIORMENTE AGREGAR UN ML DE TRIPSINA AL 0.1% POR CADA 10 ML - DE SUSPENSIÓN DE GLOBULOS ROJOS AL 4% E INCUBAR DURANTE UNA HORA A 37 °C. PARA LA SANGRE DE HAMSTER SE UTILIZA PRONASA AL 0.2%.

PASADO ESTE TIEMPO, CENTRIFUGAR PARA ELIMINAR LA ENZIMA SOBRENADANTE Y, NUEVAMENTE, CENTRIFUGAR TRES VECES CON SOLUCIÓN ISOTÓNICA. DESPUÉS DEL ÚLTIMO LAVADO SE RESUSPENDE EL PAQUETE DE ERITROCITOS AL VOLUMEN ORIGINAL.

FINALMENTE SE AJUSTA LA CONCENTRACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE GLÓBULOS ROJOS PARA LO CUAL SE UTILIZA EL ESPECTROFOTÓMETRO ACONDICIONANDO CON EL ADAPTADOR DE CELDAS, A UNA ABERTURA DE 1 cm^2 , CON AYUDA DE CINTA ADHESIVA NEGRA.

PARA EL AJUSTE DE LA CONCENTRACIÓN ES NECESARIO DILUIR LA ANTERIOR SUSPENSIÓN CON SOLUCIÓN ISOTÓNICA TOMANDO 0.5 ML DE LA SUSPENSIÓN DE GLÓBULOS DILUIDA CON DOS ML DE ESTA SOLUCIÓN SALINA Y SE LEE EN EL ESPECTROFOTÓMETRO A UNA $\lambda = 620 \text{ nm}$. EL MARGEN QUE SE DA PARA ESTE AJUSTE ES DE $25.0 \pm 3.0\%$.

MICROTITULACION. EN LAS PLACAS DE LEUCITA RÍGIDA TIPO " V " (FIG. No. 1) DEL MICROTITER. COLOCAR CON LA MICROPIPETA UNA GOTTA (EQUIVALENTE A $50 \mu\text{l}$) DE SOLUCIÓN ISOTÓNICA EN CADA POZO PROCURANDO NO TOCAR LAS PAREDES DEL MISMO. ENSEGUIDA, CON EL MICRODILUTOR TOMAR $50 \mu\text{l}$ DEL EXTRACTO PROBLEMA Y COLOCARLOS EN EL PRIMER POZO DE LA HILERA ELEGIDA Y DILUIR SUCESIVAMENTE INTRODUCIENDO EL MICRODILUTOR EN LOS SIGUIENTES POZOS Y ROTÁNDOLO SIN EXCESIVA PRESIÓN -- (FIG. No. 2). DEJAR UNA HILERA SIN EXTRACTO PARA UTILIZARLA COMO CONTROL.

FINALMENTE, COLOCAR CON LA MICROPIPETA UNA GOTTA ($50 \mu\text{l}$) DE SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS Y AJUSTADOS. ROTAR SUAVEMENTE LA PLACA EN FORMA CIRCULAR E INCUBAR A 37°C DURANTE UNA HORA. LEER EL TÍTULO EN EL DISPOSITIVO MIRANDO A TRAVÉS DEL ESPEJO EL FONDO DE LOS POZOS UTILIZANDO LA HILERA DE CONTROL COMO PRUEBA NEGATIVA Y COMPARAR CON LAS HILERAS DE LAS MUESTRAS (FIG. No. 3).

FIG No. 1

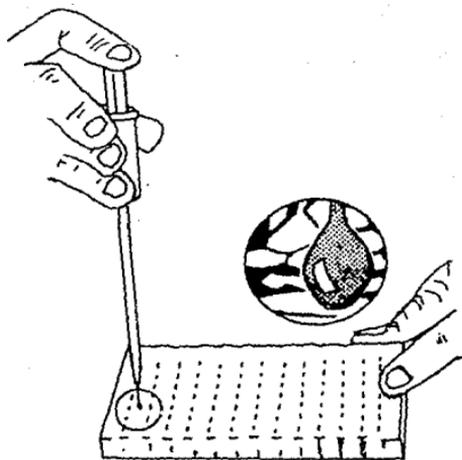


FIG. No. 2

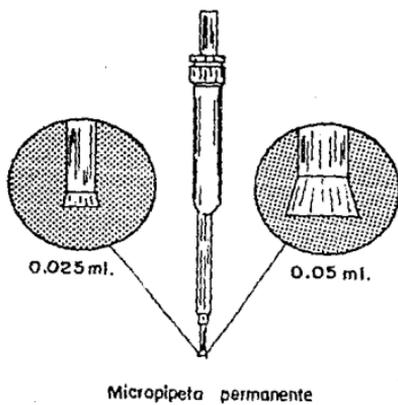
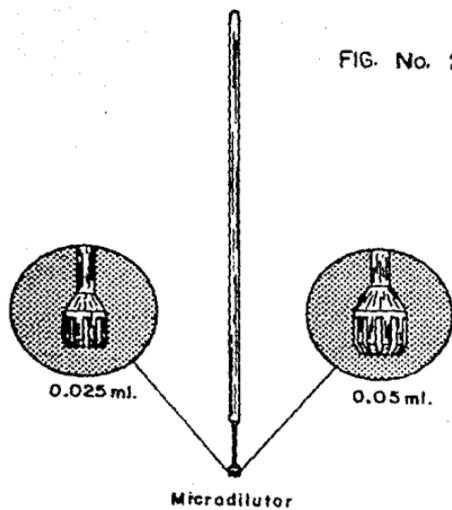
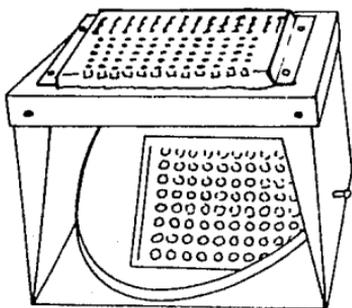
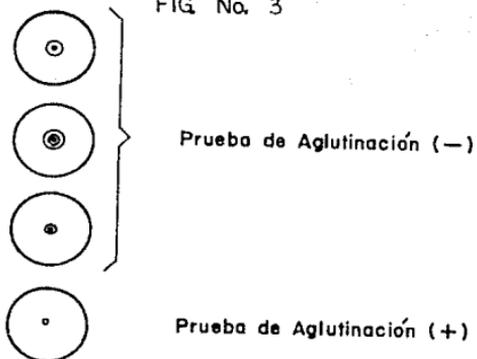


FIG. No. 3



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTOS. LA MODIFICACIÓN QUE SE HIZO PARADICHO ESTUDIO CONSISTIÓ ESPECÍFICAMENTE EN VARIAR LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO. PARA CADA UNA DE LAS SEIS LEGUMINOSAS, ADEMÁS DE PREPARAR EXTRACTOS CON --- 1000 MG. DE MUESTRA (CONCENTRACIÓN FINAL DE 100 MG/ML SOLUCIÓN SALINA AL 1%) QUE ES LO PROPUESTO EN LA METODOLOGÍA, TAMBIÉN SE HICIERON CON 25, 50, 100, 250, 500 Y 1,250 MG. PARA OBTENER CONCENTRACIONES FINALES 2.5, 5.0, 10, 25, 50 Y 125 MG/ML DE SOLUCIÓN SALINA AL 1% RESPECTIVAMENTE.

A LOS EXTRACTOS SE LES DETERMINÓ LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE CON ERITROCITOS DE HUMANO (TIPO A), CONEJO, VACA Y HAMSTER.

4.- ANALISIS ESTADISTICO

DEBIDO A QUE LA PRUEBA EN SÍ TIENE ALGO DE SUBJETIVIDAD FUE NECESARIA LA APLICACIÓN DE UN ANÁLISIS ESTADÍSTICO, Y CON ESTEFIN, EN EL PRESENTE ESTUDIO SE UTILIZARON LAS SIGUIENTES PRUEBAS (WAYNE, 1979; DUNCAN, 1955; KREYSZIG, 1978).

PRUEBA DE t DE STUDENT. PRUEBA QUE SE UTILIZA PARA DETERMINAR SI EL COMPORTAMIENTO DE DOS GRUPOS INDEPENDIENTES DIFIERE SIGNIFICATIVAMENTE.

EN ESTE CASO SE TRATA DE DETERMINAR SI EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE DOS POBLACIONES DE DATOS SUPONIENDO QUE TALES DATOS CORRESPONDEN A DOS MUESTRAS ALEATORIAS INDEPENDIENTES Y CADA UNA EXTRAÍDA DE UNA POBLACIÓN NORMALMENTE DISTRIBUIDA.

HIPOTESIS:

$$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0,$$

$$H_A: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$$

PRUEBA DE T APAREADA. ES UTILIZADA PARA DETERMINAR LA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE DOS POBLACIONES DE DATOS QUE NO SON INDEPENDIENTES Y QUE TIENEN EL MISMO TAMAÑO, ES DECIR, QUE A CADA VALOR DE LA PRIMERA MUESTRA LE CORRESPONDE PRECISAMENTE UN VALOR DE LA OTRA.

EN ESTE CASO SE UTILIZÓ CON EL MISMO FIN QUE EN LA PRUEBA ANTERIOR, ESTO ES, OBSERVAR SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MEDIAS DE LAS DOS POBLACIONES DE DATOS.

ANALISIS DE VARIANZA. CON ESTE ANÁLISIS SE INTENTARÁ PROBAR LA HIPÓTESIS NULA DE QUE TODAS LAS MEDIAS DE LAS POBLACIONES SON IGUALES, CONTRA LA ALTERNATIVA DE QUE AL MENOS UN MIEMBRO DE ESTE GRUPO ES DIFERENTE AL RESTO, LO CUAL SE PUEDE REPRESENTAR DE LA SIGUIENTE FORMA:

HIPOTESIS:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \dots = \mu_i$$

HA: AL MENOS UNA μ_i ES DIFERENTE DE LAS DEMÁS.

ANALISIS DE VARIANZA DOBLE CON REPLICACIONES. CON EL MISMO FIN QUE EL DE LA PRUEBA ANTERIOR, ESTA PRUEBA SE EMPLEA PARA DETERMINAR DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS MEDIAS DE LAS POBLACIONES PERO UTILIZANDO DOS NIVELES Y A SU VEZ REPLICACIONES. LA HIPÓTESIS A PROBAR ES LA MISMA QUE EN LA PRUEBA ANTERIOR. ADÉMÁS, SI EXISTE, SE OBTIENE EFECTO DE INTERACCIÓN.

PRUEBA DE DUNCAN. UN COMPLEMENTO DEL ANÁLISIS DE VARIANZA ES LA PRUEBA DE DUNCAN QUE DETERMINA CUÁL DE LAS MUESTRAS ES DIFERENTE DE LAS DEMÁS, YA QUE EL ANÁLISIS DE VARIANZA SOLO NOS DICE SI HAY DIFERENCIA EN EL BLOQUE, PERO NO DISCRIMINA ENTRE CUALES; POR LO QUE ES NECESARIO CONOCER LAS DIFERENCIAS INTERNAS DE ÉSTE, COSA QUE SE OBTIENE CON ESTA PRUEBA ESTADÍSTICA.

ANÁLISIS DE REGRESIÓN SIMPLE. ESTA PRUEBA NOS SERVIRÁ PARA AVERIGUAR LA FORMA PROBABLE DE LA RELACIÓN ENTRE DOS VARIABLES; CUYO OBJETO FINAL ES PREDECIR O ESTIMAR EL VALOR DADO A LA OTRA VARIABLE. EN EL MODELO DE REGRESIÓN SIMPLE SE TIENEN DOS VARIABLES X Y Y, EN DONDE POR LO COMÚN LA VARIABLE X SE LE CONOCE COMO VARIABLE INDEPENDIENTE Y LE CORRESPONDE A CADA VALOR UNO O MÁS VALORES DE Y.

UNA DE LAS SUPOSICIONES A PROBAR ES LA ESTIMACIÓN DE LA LINEARIDAD, LO CUAL SE PUEDE EXPRESAR COMO:

$$\mu_{Yx} = \alpha + \beta x$$

μ_{Yx} = A LA MEDIA DE LA SUBPOBLACIÓN DE VALORES DE Y

α = COEFICIENTE DE REGRESIÓN, REPRESENTA GEOMÉTRICAMENTE LA ORDENADA AL ORIGEN

β = COEFICIENTE DE REGRESIÓN, REPRESENTA LA PENDIENTE

DE LA ANTERIOR PRUEBA SE REALIZARON DOS TRANSFORMACIONES DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE, PARA PROBAR LA ESTIMACIÓN LINEAL LAS CUALES FUERON:

TRANSFORMACIÓN LOGARÍTMICA

$$\hat{Y} = A + B \ln X$$

TRANSFORMACIÓN EXPONENCIAL

$$\hat{Y} = A e^{BX} \quad \therefore \ln Y = B X + \ln A$$

PRUEBA DE PARALELISMO ENTRE DOS RECTAS. EN ESTA PRUEBA LO QUE SE ANALIZA ES LA PENDIENTE (B) DE LA ECUACIÓN DE REGRESIÓN, TRATANDO DE VER AL COMPARAR DOS ECUACIONES (RECTAS) SI SUS PENDIENTES

TES SON IGUALES O DIFERENTES ESTADÍSTICAMENTE, PARA LO CUAL TENEMOS LA SIGUIENTE HIPÓTESIS:

$$H_0: \beta = 0$$

$$H_A: \beta \neq 0$$

LA ANTERIOR HIPÓTESIS A PROBAR $\beta = 0$ SE REFIERE A LO MÁS USADO EN LA PRÁCTICA, PERO ESTE VALOR PUEDE SER DIFERENTE A CERO Y ES LO QUE EN EL PRESENTE TRABAJO SE UTILIZARÁ COMO LA HIPÓTESIS NULA O SEA, UN VALOR DIFERENTE A CERO.

V. RESULTADOS

EN LOS CUADROS 2 Y 3 SE PRESENTAN LOS TÍTULOS OBTENIDOS DE LA DETERMINACIÓN DE LECTINAS EN LAS SEIS MUESTRAS CON LAS CUATRO ESPECIES DE ERITROCITOS.

CUADRO No. 2 TITULOS PARA SEMILLAS TOXICAS EN FORMA CRUDA

FRIJOL NEGRO JAMAPA (<i>Phaseolus vulgaris</i>) (FN) *				
Concentración mg. muestra/ml.	TIPO DE SANGRE			
	Conejo (Sc) *	Humano (Sh) *	Vaca(Sv)*	Hamster (Sh) *
2.5	3,3,3	4,4,4,3	2,2,2	4,4,4
5.0	4,4,3	5,5,5	3,3,3,2	5,5,5
10.0	5,5,4	6,6,6	4,4,4	6,6,6
25.0	6,6,6	8,7,8	6,5,5	7,7,7,7,6,6
50.0	6,7,7,6,7	9,9,9,9,8	6,6,6	8,8,8,9,8,7
100.0	8,8,8,8,7	10,10,10,9,10	7,7,7,7,8	10,10,10,10,9,10
125.0	8,9,9,8,7	10,10,10,10	8,8,8,7,8	10,10,10,11,10,11
ALVERJON (<i>Canavalia ensiformis</i>) (A) *				
2.5	5,5,5	0,1,0	2,1,2	6,6,6
5.0	7,7,7	1,1,1	3,2,3	7,7,7,8,7
10.0	8,8,8,8,7	2,2,2	3,4,4	9,9,9,8,8
25.0	9,9,9	3,3,3	5,5,5	10,10,10,11,12
50.0	11,10,11	3,4,4	6,5,6,6,6	12,12,12,11,11
100.0	12,12,13,12	4,5,4,5,4	7,7,6,7,7	13,13,13
125.0	12,13,12,12	5,6,6,5,5	7,6,7,7,7	15,15,15
FRIJOL DEL MONTE (<i>Phaseolus lunatus</i>) (FM) *				
2.5	-	3,3,3	-	3,3,3
5.0	-	4,4,4	-	5,5,5,4,5
10.0	--	5,5,6	-	6,6,6
25.0	--	6,6,6,7,7	-	7,7,7,7,8
50.0	--	7,7,7,7,8	-	8,8,8,7,7
100.0	--	8,8,8,9,9	-	9,9,9,9,8
125.0	--	9,9,9,8,10	-	9,10,10,8,9,9

* DICHAS SIGLAS SE UTILIZARÁN COMO ABBREVIATURAS A LO LARGO DEL PRESENTE ESTUDIO.

CUADRO No. 3 TITULOS PARA SEMILLAS NO TOXICAS EN FORMA CRUDA

LENTEJA (<i>Lens culinaris</i>) (L) *				
Concentración mg. muestra/ml.	TIPO DE SANGRE			
	Coneja (Sc) *	Humano (Sh) *	Vaca (Sv) *	Hamster (Sh) *
2.5	2, 2, 2	—	—	3, 3, 3
5.0	3, 2, 3	—	—	4, 4, 4
10.0	4, 4, 4	—	—	5, 5, 5
25.0	5, 5, 6	—	—	6, 6, 6
50.0	6, 6, 6	—	—	7, 8, 8, 7, 8
100.0	7, 6, 6, 6, 7	—	—	9, 9, 9, 9, 8
125.0	6, 7, 7, 6, 7	—	—	9, 9, 9, 8, 10, 9
CHICHARO (<i>Pisum sativum</i>) (CH) *				
2.5	2, 2, 2	—	—	3, 3, 3
5.0	3, 2, 3	—	—	4, 4, 4
10.0	3, 4, 4	—	—	5, 5, 5
25.0	5, 5, 5	—	—	6, 6, 6, 5, 6
50.0	6, 6, 6, 7	—	—	7, 7, 7, 8, 8
100.0	7, 7, 7, 7	—	—	8, 8, 8, 7, 8
125.0	8, 8, 7, 7	—	—	8, 8, 8, 8, 8
HABA (<i>Vicia faba</i>) (H) *				
2.5	2, 1, 1, 1	—	—	2, 2, 2, 1, 2
5.0	2, 2, 2	—	—	3, 3, 3
10.0	3, 3, 3	—	—	4, 4, 4, 5, 4
25.0	4, 4, 4	—	—	5, 5, 5
50.0	4, 5, 5	—	—	6, 6, 6, 7, 7
100.0	6, 6, 6, 7, 6, 8	—	—	7, 7, 7, 6, 8
125.0	6, 7, 7, 7, 7, 7	—	—	7, 7, 8, 7, 8

* DICHAS SIGLAS SE UTILIZARÁN COMO ABBREVIATURAS A LO LARGO DEL PRESENTE ESTUDIO.

LOS DATOS ANTERIORES SE ANALIZARON ESTADÍSTICAMENTE CONSIDERÁNDOSE COMO PRIMER ESTUDIO UN SOLO EXPERIMENTO, PARA TENER EL MISMO NÚMERO DE REPETICIONES, YA QUE ASÍ LO -

REQUIERE DICHO ANÁLISIS DE VARIANZA, LA SIGUIENTE INFORMACIÓN CORRESPONDE AL ANÁLISIS DE VARIANZA Y A LA PRUEBA DE DUNCAN. LOS NIVELES ANALIZADOS FUERON: CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS (HILERAS) Y ESPECIES DE ERITROCITOS (COLUMNAS) POR SEPARADO PARA CADA UNA DE LAS SEIS MUESTRAS.

CUADRO No. 4 SEMILLAS TOXICAS EN FORMA CRUDA

FRIJOL NEGRO JAMAPA (<i>Phaseolus vulgaris</i>) (FN)				
ANÁLISIS DE VARIANZA				PRUEBA DE DUNCAN ^(A)
Fuente de variación	Grados de libertad	F _s	Diferencia significativa	
Subgrupos	27			FN ₁ FN ₂ FN ₃ FN ₄ FN ₅ FN ₆ FN ₇ ^(B)
Hileras	6	859.21	SI	
Columnas	3	361.26		
Interacción	18	3.22		S _v S _c S _h S _H
Error	56			
ALVERJON (<i>Canavalia ensiformis</i>) (A)				
Subgrupos	27			A ₁ A ₂ A ₃ A ₄ A ₅ A ₆ A ₇ ^(B)
Hileras	6	423.92	SI	
Columnas	3	1620.91		
Interacción	18	9.52		S _v S _H S _c S _h
Error	56			
FRIJOL DEL MONTE (<i>Phaseolus lunatus</i>) (FM)				
Subgrupos	27			FM ₁ FM ₂ FM ₃ FM ₄ FM ₅ FM ₆ FM ₇ ^(B)
Hileras	6	628.66	SI	
Columnas	3	12235.3		
Interacción	18	212.44		S _c S _v S _H S _h
Error	56			

CUADRO No. 5 SEMILLAS NO TOXICAS EN FORMA CRUDA

LENTEJA (<i>Lens culinaris</i>) (L)				
ANALISIS DE VARIANZA				PRUEBA DE DUNCAN ^(A)
Fuente de variación	Grados de libertad	F _s	Diferencia significativa	
Subgrupos	27			(B)
Hileras	6	223.73	SI	L ₁ L ₂ L ₃ L ₄ L ₅ L ₆ L ₇
Columnas	3	3663.2		
Interacción	18	79.2		
Error	56			S _V S _H S _C S _H (A) ←————→
CHICHARO (<i>Pisum sativum</i>) (CH)				
Subgrupos	27			(B)
Hileras	6	355.0	SI	C ₁ C ₂ C ₃ C ₄ C ₅ C ₆ C ₇
Columnas	3	5723.0		
Interacción	18	119.88		
Error	56			S _V S _H S _C S _H (A) ←————→
HABA (<i>Vicia faba</i>) (H)				
Subgrupos	27			(B)
Hileras	6	204.45	SI	H ₁ H ₂ H ₃ H ₄ H ₅ H ₆ H ₇
Columnas	3	2858.91		
Interacción	18	102.95		
Error	56			S _V S _H S _C S _H (A) ←————→

(A) DONDE SE PRESENTAN BANDAS ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS, IMPLICA QUE NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

(B) LOS SUBINDICES CORRESPONDEN A LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES Y VAN EN ORDEN ASCENDENTE, O SEA DE 2.5 MG/ML (1) A 125 MG/ML (7).

DEBIDO A QUE LA INFORMACIÓN OBTENIDA CON ESTE ANÁLISIS - ESTADÍSTICO NOS INDICA, EN TÉRMINOS GLOBALES, QUE HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA TANTO ENTRE LAS CONCENTRACIONES COMO LA ESPECIE DE ERITROCITOS TRABAJADOS, SE RECURRIÓ A UN ANÁLISIS ESTADÍSTICO -- DONDE SE PUDIERA MANEJAR TODA LA INFORMACIÓN SIN PÉRDIDA DE NINGÚN DATO.

LA PRIMERA PRUEBA QUE SE HIZO FUE LA DE T DE STUDENT, - COMPARANDO LOS TÍTULOS OBTENIDOS DE LAS SANGRES DE HAMSTER Y CO NEJO CON LAS SIETE CONCENTRACIONES DE CADA LEGUMINOSA.

SE ELIGIERON ESTOS DATOS PORQUE FUERON LAS SANGRES MÁS - SENSIBLES EN TODOS LOS EXTRACTOS.

CUADRO No. 6 PRUEBA DE T

Prueba	Grados de libertad	T	Diferencia Significativa
T apareada	42	6.02	SI
T simple	250	5.688	SI

UNA VEZ QUE SE OBSERVÓ QUE SÍ HABÍA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LAS DOS POBLACIONES DE DATOS EN DONDE LA SANGRE DE HAMSTER - MANIFESTABA MAYOR SENSIBILIDAD, SE REALIZÓ EL ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE Y LA PRUEBA DE DUNCAN CUYOS RESULTADOS SE MUESTRAN A - CONTINUACIÓN. SE COMPARARON LOS TÍTULOS OBTENIDOS DE ESTA SANGRE CON CADA CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO.

CUADRO No. 7

Muestra	Análisis de varianza		Prueba de Duncan ^(A)
	F	Diferencia significativa	

SEMILLAS TOXICAS	Frijol negro Jamapa (FN)	123.35	SI	FN ₁ FN ₂ FN ₃ FN ₄ FN ₅ FN ₆ FN ₇
	Alverjon (A)	30.81	SI	A ₁ A ₂ A ₃ A ₄ A ₅ A ₆ A ₇
	Frijol del monte (F.M.)	78.73	SI	FM ₁ FM ₂ FM ₃ FM ₄ FM ₅ FM ₆ FM ₇

SEMILLAS NO TOXICAS	Lenteja (L)	144.04	SI	L ₁ L ₂ L ₃ L ₄ L ₅ L ₆ L ₇
	Chicharo (C)	128.86	SI	C ₁ C ₂ C ₃ C ₄ C ₅ C ₆ C ₇
	Haba (H)	83.13	SI	H ₁ H ₂ H ₃ H ₄ H ₅ H ₆ H ₇

(A) = DONDE SE PRESENTAN BANDAS ENTRE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES, IMPLICA QUE NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

DESPUÉS DE HABER REALIZADO EL ESTUDIO PARA DETERMINAR EL MEJOR AJUSTE DE REGRESIÓN, SE ELIGIÓ LA LOGARÍTMICA PORQUE SE OBTUVIERON COEFICIENTES DE CORRELACIÓN (R) MÁS CERCANOS A UNO, - YA QUE R DETERMINA CON QUÉ APROXIMACIÓN SE AJUSTAN LOS DATOS A UNA LÍNEA RECTA; PARA EL CASO DE $R = 1$ LOS DATOS CAEN EXACTAMENTE SOBRE UNA LÍNEA RECTA DE PENDIENTE POSITIVA. EN EL CUADRO 8 SE PRESENTAN LAS ECUACIONES DE REGRESIÓN PARA CADA UNA DE LAS SEIS MUESTRAS.

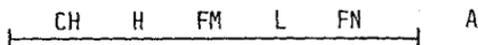
CUADRO No. 8

ANÁLISIS DE REGRESIÓN		
Muestra	R	Ecuación
Semillas tóxicas		
Frijol negro Jamapa (FN)	0.9858	$\hat{y} = 2.3846 + 3.5492 \log. x$
Alverjón (A)	0.9873	$\hat{y} = 3.8209 + 4.8709 \log. x$
Frijol del monte (FM)	0.9871	$\hat{y} = 2.2141 + 3.3433 \log. x$
Semillas no tóxicas		
Lenteja (L)	0.9957	$\hat{y} = 1.4909 + 3.5265 \log. x$
Chicharo (C)	0.9933	$\hat{y} = 1.8929 + 2.9873 \log. x$
Haba (H)	0.9957	$\hat{y} = 0.7067 + 3.2132 \log. x$

CON RESPECTO A LA PRUEBA DE PARALELISIDAD NOS INDICÓ QUE EL COMPORTAMIENTO DE LAS SIEMBRAS LEGUMINOSAS SE CLASIFICA EN DOS GRUPOS:

EL PRIMERO FORMADO POR CHÍCHARO, HABA, FRIJOL DEL MONTE, LENTEJA Y FRIJOL NEGRO JAMAPA, Y EL SEGUNDO POR EL ALVERJÓN.

EN LA GRÁFICA SIGUIENTE PUEDE APRECIARSE MÁS CLARAMENTE DICHA AGRUPACIÓN LA CUAL SE REPRESENTA DE LA SIGUIENTE MANERA, DONDE LAS MUESTRAS ESTÁN ORDENADAS EN FORMA ASCENDENTE EN BASE AL VALOR DE LA PENDIENTE.



VI. DISCUSION DE RESULTADOS

EN BASE A LA CLASIFICACIÓN PROPUESTA POR JAFFÉ Y COL. --- (1972), QUIENES DISTINGUIERON 4 TIPOS DIFERENTES DE LECTINAS, DE ACUERDO A LA AGLUTINACIÓN SOBRE ERITROCITOS DE VACA Y CONEJO;-- PODEMOS VER DE LOS CUADROS 2 Y 3, QUE LOS EXTRACTOS DEL FRIJOL NE GRO JAMAPA Y ALVERJÓN SE PUEDEN CLASIFICAR COMO DEL TIPO A, YA -- QUE AGLUTINAN TANTO LA SANGRE DE VACA Y CONEJO Y POR LO TANTO SE PUEDEN CONSIDERAR COMO TÓXICAS POR VÍA ORAL. LO ANTERIOR CONCUERDA CON LO REPORTADO CON LINDER (1964), YA QUE ESTE INVESTIGADOR CONSIDERA QUE LA TOXICIDAD DE ESTAS LEGUMINOSAS SE DEBE PRINCIPALMENTE A LAS LECTINAS QUE CONTIENEN

EN ESTOS CUADROS TAMBIÉN SE OBSERVA QUE LOS ERITROCITOS DE HAMS-- TER SON LOS ÚNICOS QUE SE AGLUTINAN CON TODOS LOS EXTRACTOS DE CA DA UNA DE LAS SEIS MUESTRAS, LO CUAL SE ESPERABA POR SER LA MÁS - SENSIBLE E INESPECÍFICA PUES SEGÚN SE HA INFORMADO (JAFFÉ, 1972) CON ESTOS ERITROCITOS TRATADOS CON PRONASA SE PUEDE DETECTAR ACTI VIDAD HEMAGLUTINANTE EN EXTRACTOS QUE CONTENGAN CUALQUIER HEMAGLU TININA.

CON RESPECTO AL FRIJOL DEL MONTE, SE HA INFORMADO QUE SUS LECTINAS SON ESPECÍFICAS PARA LOS ERITROCITOS DE HUMANO TIPO A -- (WESTER, 1971) Y QUE SU TOXICIDAD SE DEBE PRINCIPALMENTE A LOS GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS QUE CONTIENE; LO CUAL FUE CONFIRMADO YA - QUE SOLO AGLUTINÓ A ESTOS ERITROCITOS Y A PESAR DE SER TÓXICO NO INTERACCIONO CON LA SANGRE DE VACA. POR LO TANTO, SE PODRÍA CLASI FICAR COMO DEL TIPO B, COSA QUE PUEDE PARECER CONTRADICTORIA POR QUE EL TIPO B ES REPORTADO COMO NO TÓXICO; SIN EMBARGO, ESTO PUE DE TEHER UNA EXPLICACIÓN LÓGICA, SI MENCIONAMOS QUE EN ESTE TIPO DE FRIJOL, LOS COMPUESTOS RESPONSABLES DE TOXICIDAD ESTÁN ASO--- CIADOS A LA PRESENCIA DE LOS GLUCÓSIDOS CIANOGENÍCOS.

LAS SEMILLAS NO TÓXICAS EN FORMA CRUDA COMO LA LENTEJA, CHÍCHARO Y HABA SE CLASIFICAN DENTRO DEL TIPO B, PUES SOLO PRESENTAN ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE SOBRE ERITROCITOS DE HAMSTER Y DE CONEJO. EN EXPERIMENTOS EN LOS QUE HAN ALIMENTADO A RATAS -- CON DIETAS QUE CONTIENEN ESTAS LEGUMINOSAS, YA SEA CRUDAS O COCIDAS, SE HA NOTADO EN AMBAS QUE SE CAUSA UN EFECTO SIMILAR EN EL CRECIMIENTO DE LOS ANIMALES. ESTO PUEDE INDICAR QUE LAS LECTINAS DE ESTAS SEMILLAS NO SON TÓXICAS O QUE SU CONCENTRACIÓN - EN ÉSTAS ES TAL QUE NO PRODUCE UN EFECTO IMPORTANTE.

CON TODAS LAS MUESTRAS SE OBSERVA QUE CONFORME AUMENTA LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO, AUMENTA TAMBIÉN EL TÍTULO, PERO APROXIMADAMENTE A UNA CONCENTRACIÓN DE 100MG/ML ESTE AUMENTO ES MENOS NOTORIO, Y EN ALGUNOS CASOS NO LO HAY, SIENDO TAL VEZ LA RAZÓN LA SATURACIÓN DEL EXTRACTO PROVOCANDO LA INVARIABILIDAD - DEL TÍTULO.

POR OTRA PARTE, LOS RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO NOS INDICA LO SIGUIENTE:

LA PRIMERA PRUEBA QUE SE HIZO FUE EL ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS NIVELES Y LA PRUEBA DE DUNCAN POR SEPARADO PARA CADA UNA DE LAS SEIS MUESTRAS. DESAFORTUNADAMENTE, ESTE ANÁLISIS SOLO NOS DA UNA INFORMACIÓN A NIVEL GLOBAL YA QUE COMO SE PRESENTA EN LOS CUADROS 4 Y 5 SE ENCONTRÓ QUE SI HABÍA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE LOS EXTRACTOS Y QUE CADA UNO ERA DIFERENTE DE LOS OTROS, A EXCEPCIÓN DE LA LENTEJA DONDE LAS CONCENTRACIONES L₆ Y L₇ RESULTARON IGUALES.

CON LAS SANGRES SUCEDIÓ ALGO SIMILAR PUES SOLO LAS QUE NO PRESENTARON AGLUTINACIÓN RESULTARON IGUALES.

DEBE CONSIDERARSE QUE ESTO FUE UN SOLO EXPERIMENTO PARA TENER IGUAL NÚMERO DE REPLICACIONES, Y EN DONDE HUBO NECESIDAD DE SACRIFICAR ALGUNOS DATOS.

DEBIDO A LO ANTERIOR, SE REALIZÓ LA PRUEBA DE T EMPLEANDO ÚNICAMENTE LOS TÍTULOS DE LA SANGRE DE CONEJO Y HAMSTER POR -

SER LAS QUE PRESENTARON MAYOR SENSIBILIDAD HACIA LAS SEIS LEGUMINOSAS ESTUDIADAS.

EL RESULTADO DE ESTA PRUEBA NOS INDICÓ QUE LA SANGRE DE HAMSTER ES LA MÁS SENSIBLE DE TODAS LAS ESTUDIADAS Y FUE LA CUAL SE SELECCIONÓ PARA EL POSTERIOR ESTUDIO ESTADÍSTICO.

EN BASE A ESTE HECHO SE REALIZÓ EL ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE Y LA PRUEBA DE DUNCAN, Y COMO SE MENCIONÓ ANTERIORMENTE, SOLO SE ANALIZARON LOS TÍTULOS DE LA SANGRE DE HAMSTER CON RESPECTO A LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO; ENCONTRÁNDOSE QUE HABÍA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA; SIN EMBARGO SE MANIFESTÓ UNA TENDENCIA A LAS MÁS ALTAS CONCENTRACIONES (50, 100 Y 125 MG/ML) DE NO DIFERENCIA, ES DECIR, EN ESTOS EXTRACTOS YA NO SE DISCRIMINA EL TÍTULO ADECUADAMENTE LO CUAL PUEDE DEBERSE A UNA SATURACIÓN; ESTOS RESULTADOS SE PRESENTAN EN EL CUADRO No. 7 .

PARA EL CASO DEL ALVERJÓN LOS TÍTULOS OBTENIDOS SE DESVIAN CON RESPECTO A LOS DE LAS DEMÁS MUESTRAS, PUES ESTA TENDENCIA SE OBSERVA EN LAS PRIMERAS CONCENTRACIONES LO CUAL PUEDE DEBERSE A ERROR EXPERIMENTAL DURANTE LA MANIPULACIÓN.

EN GENERAL, AL AUMENTAR LA CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS LA DISCRIMINACIÓN DEL TÍTULO SE DIFICULTA MÁS.

INDEPENDIEMENTE DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO, OBSERVACIONES PERSONALES PERMITEN AFIRMAR LO ANTERIOR, PUES DESPUÉS DE LA CONCENTRACIÓN DE 100 MG/ML SE DIFICULTABA DEFINIR EL PUNTO FINAL DE LA DETERMINACIÓN. A LAS CONCENTRACIONES MÁS BAJAS ESTO ERA MUY FÁCIL YA QUE DE UN POZO A OTRO SE DISTINGUÍA CLARAMENTE HASTA DONDE SE PRESENTABA LA AGLUTINACIÓN, MIENTRAS QUE CON LAS MÁS ALTAS CONCENTRACIONES SE DUDABA MUCHO EN DISCERNIR EL POSITIVO DEL NEGATIVO, HACIÉNDOSE LA PRUEBA MÁS SUBJETIVA Y POR LO TANTO PRESENTANDO MAYOR VARIACIÓN, SOBRE TODO CON LAS MUESTRAS CUYO CONTENIDO DE LECTINAS ES MAYOR; COMO ES EL CASO DEL FRIJOL NEGRO JAMAICA Y EL ALVERJÓN.

OTRO PUNTO INTERESANTE ES LA CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS PUES SE ALMACENARON A TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN OBSERVÁNDOSE QUE LOS DE MENOR CONCENTRACIÓN, EN UN LAPSO DE UN MES APROXIMADAMENTE, NO PRESENTARON MODIFICACIONES COMO CAMBIO DE COLORACIÓN, FORMACIÓN DE NATA EN LA SUPERFICIE O PÉRDIDA DE ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE, MIENTRAS QUE LOS DEMÁS SÍ.

DURANTE LA PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS AL UTILIZAR CANTIDADES DE MUESTRA MAYORES DE 500 MG DISMINUÍA LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN PUES SE DIFICULTABA LA MANIPULACIÓN.

EN CUANTO A LA CANTIDAD ÓPTIMA PARA PREPARAR EL EXTRACTO SE CONSIDERA QUE 100 MG DE MUESTRA LLEVADO A 10 ML ES LO ADECUADO, PORQUE A DICHA CONCENTRACIÓN NO SE PRESENTAN LOS PROBLEMAS MENCIONADOS ANTERIORMENTE Y SE TIENE LA VENTAJA DE QUE LA DETERMINACIÓN ES MÁS REPRODUCIBLE Y PRECISA.

FINALMENTE, EN EL CUADRO 8 LAS ECUACIONES DE REGRESIÓN LOGARÍTMICA PRESENTAN PENDIENTES MUY SIMILARES QUE HACEN PENSAR QUE LAS MUESTRAS TIENEN COMPORTAMIENTOS SEMEJANTES A EXCEPCIÓN DEL ALVERJÓN. EN LA GRÁFICA PUEDE APRECIARSE MÁS FACILMENTE TAL DIFERENCIA.

LA PRUEBA DE HIPÓTESIS PARA ENCONTRAR DIFERENCIA O SEMEJANZA EN EL COMPORTAMIENTO DETERMINÓ QUE LAS MUESTRAS PUEDEN -- CLASIFICARSE EN DOS GRUPOS FORMADOS POR: HABA, FRIJOL DEL MONTE, LENTEJA Y FRIJOL NEGRO JAMAPA Y OTRO POR CHÍCHARO, HABA Y FRIJOL DEL MONTE, QUEDANDO FUERA DE LOS DOS GRUPOS EL ALVERJÓN. ADEMÁS, EN ESTA AGRUPACIÓN NO INFLUYE EL HECHO DE QUE LAS MUESTRAS SEAN TÓXICAS O NO TÓXICAS. E INCLUSO SOLO SE HUBIERAN CLASIFICADO EN UN SOLO GRUPO QUE INCLUÍA AL CHÍCHARO, DE NO SER -- POR UNA PEQUEÑA DIFERENCIA CON EL VALOR DE T EN LA COMPARACIÓN -- POR PAREJAS DE LAS PENDIENTES.

POR LO TANTO, SE PUEDE DECIR QUE LAS MUESTRAS TIENEN COMPORTAMIENTO SEMEJANTE, SEAN TÓXICAS O NO TÓXICAS Y ES FACTIBLE HACER

LA DETERMINACIÓN DE LECTINAS CON UNA CANTIDAD DE MUESTRA MENOR, YA QUE UNA VEZ DETERMINADA SU ECUACIÓN, POR SIMPLE EXTRAPOLACIÓN SE PUEDE PREDECIR EL VALOR QUE CORRESPONDE AL MANEJAR LA CANTIDAD DE MUESTRA PROPUESTA EN LA METODOLOGÍA ORIGINAL.

VII. CONCLUSIONES

1.- LAS LEGUMINOSAS ESTUDIADAS PUEDEN CLASIFICARSE COMO SIGUE:

FRIJOL NEGRO JAMAPA Y ALVERJÓN	TIPO A
FRIJOL DEL MONTE	TIPO B
LENTEJA, HABA Y CHÍCHARO	TIPO B

2.- EN CUANTO A LAS SANGRES PODEMOS CONCLUIR QUE:

LA SANGRE DE HAMSTER ES LA MÁS SENSIBLE E INESPECÍFICA POR LO CUAL SERÍA LA MÁS RECOMENDABLE PARA UNA PRUEBA DE SELECCIÓN - (SCREENING) DE LA PRESENCIA DE ESTE TIPO DE TÓXICO; EN TANTO QUE PODEMOS MANIFESTAR QUE LA SANGRE DE VACA NOS CORRELACIONA MEJOR PARA VER EFECTO DE TOXICIDAD Y AUNQUE PARA EL CASO DEL FRIJOL DEL MONTE (PHASEOLUS LUNATUS), NO DIÓ PRUEBA POSITIVA, SE SABE QUE EN ESTE TIPO DE FRIJOL SU ACTIVIDAD TÓXICA SE ASOCIA MÁS A LA PRESENCIA DE GLUCÓSIDOS CIANOGENÉICOS - QUE A LAS LECTINAS ESPECÍFICAS QUE CONTIENE.

3.- EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO DE LAS LEGUMINOSAS ESTUDIADAS, TANTO TÓXICAS COMO NO TÓXICAS, ES DIRECTAMENTE -- PROPORCIONAL, ES DECIR, AL AUMENTAR DICHA CONCENTRACIÓN AUMENTA EL TÍTULO; SIN EMBARGO ESTA RELACIÓN DESAPARECE A MEDIDA - QUE AUMENTA LA CANTIDAD DE MATERIAL PUES SE EMPIEZA A MANIFESTAR UNA SATURACIÓN DEL EXTRACTO.

POR LO TANTO LA CANTIDAD QUE SE PROPONE PARA PREPARAR EL EXTRACTO ES DE 100 MG; CON LA VENTAJA DE REALIZAR DETERMINACIONES CON MAYOR REPRODUCIBILIDAD, FÁCIL MANIPULACIÓN Y UTILIZANDO MENOR CANTIDAD DE MUESTRA QUE SI SE EMPLEARA UN GRAMO DE - LEGUMINOSA QUE ES LA INDICADA EN LA METODOLOGÍA ORIGINAL. ADEMÁS SE OBSERVA UNA MEJOR CONSERVACIÓN DE DICHO EXTRACTO AL ALMACENARSE A LA TEMPERATURA DE REFRIGERACIÓN.

B I B L I O G R A F I A

- BENDER, A.E. 1983. HAEMAGGLUTININS (LECTINS) IN BEANS. FOOD -- CHEM. 11: 309-320.
- BOYD, W.C., REGUERA, R.M. 1949. HEMAGGLUTINATING SUBSTANCES FOR - HUMAN CELLS IN VARIOUS PLANTS. J. IMMUNOL. 62: 333-339.
- DE MUELENAERE, H.J.H. 1965. TOXICITY AND HEMAGGLUTINATING ACTI_VI TY OF LEGUMES. NATURE. 206: 827-828.
- DUNCAN, D.B. 1955. MULTIPLE RANGE AND MULTIPLE F TEST. BIOMETRICS. 11: 1-42.
- ETZLER, M.E. 1986. DISTRIBUTION AND FUNCTION OF PLANTS LECTINS IN: THE LECTINS PROPERTIES FUNCTIONS AND APLICATIONS IN BIOLO_GY AND MEDICINE. (ED. BY ETZLER, M.E.) P.P. 371-435. --- ACADEMIC PRESS, NEW YORK.
- HARA, T., TSUKAMOTO, I. AND MIYOSHI, M. 1983. ORAL TOXICITY OF KIN_TOKI BEAN (PHASEOLUS VULGARIS) LECTIN. J. NUTR. SCI. VI-TAMINOL. 29: 586-599.
- JAFFÉ, W.G. 1980. HEMAGGLUTININS (LECTINS). IN: TOXIC CONSTITU-- ENTS OF PLANT FOOD STUFFS. (ED. BY LIENER, I.E.) P.P. -- 73-102. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.
- JAFFÉ, W.G. 1973. TOXIC PROTEINS AND PEPTIDES. IN: TOXICANTS OCCU-- RRING NATURALLY IN FOOD. (ED. BY LIENER, I.E.) P.P. 106- 129. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.

- JAFFÉ, W.G., BRUCHER, O. 1972. TOXICIDAD Y ESPECIFICIDAD DE DIFERENTES FITOHEMAGLUTININAS DE FRIJOLES. ARCH. LATINOAM. - NUTR. 22: 267-281.
- JAFFÉ, W.G. LEVY, A. AND GONZÁLEZ, D.I. 1974. ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF BEAN PHYTOHAEMAGGLUTININS. PHYTOCHEM. 13: 2685-2693.
- KREYSZIG, E. 1978. ESTADÍSTICA MATEMÁTICA. PRINCIPIOS Y MÉTODOS. PÁG. 168, 234. LIMUSA. MÉXICO.
- LIENER, I.E. 1986. NUTRITIONAL SIGNIFICANCE OF LECTINS IN THE DIET. IN: THE LECTINS: PROPERTIES, FUNCTIONS AND APPLICATIONS IN BIOLOGY AND MEDICINE. (ED. BY ETZLER, M.E.) - P.P. 527-552. ACADEMIC PRESS. NEW YORK.
- LIENER, I.E. 1964. SEED HEMAGGLUTININS. ECON BOT. 18: 27-33.
- LIENER, I.E. 1955. THE FOTOMETRIC DÉTERMINATION OF THE HEMAGGLUTINATING ACTIVITY OF SOYIN AND CRUDE SOYBEAN EXTRACTS. - ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 54: 223-231.
- LINDNER, E. 1978. TOXICOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS. PÁG. 1-4. ACRIBIA. ZARAGOZA.
- LIS, H. AND SHARON, N. 1981a. LECTINS IN HIGHER PLANTS. IN: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS. A COMPREHENSIVE TREATISE. (ED. BY STUMPF, P.K., CONN, K.E.) VOL. 6, P.P. 371-447. ACADEMIC PRESS, NEW YORK.
- LIS, H. AND SHARON, N. 1981b. BIOLOGICAL PROPERTIES OF LECTINS. - IN: THE BIOCHEMISTRY OF PLANTS. A COMPREHENSIVE TREATISE. (ED. BY STUMPF, P.K., CONN, K.E.) VOL. 6, P.P. 265-291. ACADEMIC PRESS, NEW YORK.

- NAKATA, S. AND KIMURA, T. 1985. EFFECT OF INGEST TOXIC BEAN LECTINS ON THE GASTROINTESTINAL TRAXT IN THE RAT. J. NUTR. 115: -- 1621-1629.
- OSTLE, B. 1983. ESTADÍSTICA APLICADA. PÁG. 105, 326. LIMUSA, MÉXICO.
- SCHERTZ, K.F. AND BOYD, W.C. 1960. SEED EXTRACTS WITH AGGLUTINATING ACTIVITY FOR HUMAN BLOOD. PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 46: 529-532.
- TAKAHASHI, T. AND RAMACHANDRAMURTHY, P., LIENER, I.E. 1967. SOME SOME PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF A PHYTOHAMAGGLUTININ ISOLATED FROM PHASEOLUS VULGARIS. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 133: 123-133.
- WAYNE, W.D. 1979. BIOESTADÍSTICA. BASE PARA EL ANÁLISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD. PÁG. 263-266, LIMUSA, MÉXICO.
- WESTER, A., TOMS, G.C. 1971. PHYTOHEMAGGLUTININS. IN: CHEMOTAXONOMY OF THE LEGUMINOSAE. (ED. BY HARBONE, J.B., BOUTLER, D. AND TURNER, B.L.) P.P. 367-462, ACADEMIC PRESS, NEW YORK.
- YAMANE, T. 1979. ESTADÍSTICA. PÁG. 339, 448-453, HARLA.MÉXICO.