

CARACTERIZACION DEL EFECTO AGLUTINANTE DE LECTINAS DE LA FAMILIA DE LAS FABACEAS SOBRE LOS ERITROCITOS HUMANOS MEDIANTE EL ANALISIS DE IMÁGENES

M. V. Rodríguez[°], B. Riquelme[°] [§], J. Valverde[§] [^] y S. Gattuso[~]

[°] Área Física, Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

[^] Grupo de Óptica Aplicada a la Biología, IFIR (CONICET-UNR)

[~] Área Inmunohematología, Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

[§] Área Botánica, Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

En este trabajo se estudió, mediante el análisis de imágenes digitales, las dimensiones y características de los aglutinados formados por lectinas provenientes de la familia de las Fabáceas (legumbres) que abundan en nuestra región, calculándose el ASP (Agglutination Shape Parameter) el cual permite caracterizar y evaluar el grado de aglutinación de las mismas. Los resultados obtenidos son de utilidad como un parámetro adicional del control de calidad, lo que permitiría que las lectinas estudiadas puedan ser utilizarlas como reactivos hemoclasificadores en un laboratorio Inmunohematológico.

In this paper, the digital image analysis was applied to study the dimensions and characteristics of the agglutination of erythrocyte linked by lectins obtained from Fabaceas's family that exist in our region. The ASP (Agglutination Shape Parameter) for the agglutinates was determined. This parameter allows us to characterize and evaluate the agglutination degree. The evidence obtained could be useful as a parameter for the lectins quality control. Thus, the present study provides important information about the use of these lectins as hemoclassificator reagents in the Inmunohematology laboratory.

I. INTRODUCCION

Las lectinas vegetales son proteínas que cumplen funciones de transporte e inmovilización de los carbohidratos¹. Por esto, algunas lectinas reconocen carbohidratos que forman parte específica de determinantes de grupos sanguíneos humanos. Las lectinas se definen actualmente como proteínas o glicoproteínas ubicuas, de origen no inmune, capaces de reconocer e interactuar reversiblemente con carbohidratos en solución o de superficies celulares. El interés de su estudio se debe a las diversas actividades biológicas que pueden inducir, tales como aglutinación de eritrocitos humanos y animales (hemaglutinación), aglutinación de células malignas, actividad inmunosupresora, etc. En virtud de esta propiedad se han convertido en herramientas útiles no sólo para la purificación de polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos, sino también para evidenciar la topología de superficies celulares y los cambios inducidos por transformaciones de las mismas².

Fenómeno de aglutinación eritrocitaria

La aglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específica (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos*) sobre la superficie celular (figuras 1a y 1b). Este proceso, depende del número de determinantes antigénicos y de su localización sobre la célula, como así también del tipo de macromolécula y del medio de reacción³.

* Los antígenos definidos por estructuras de azúcares, son productos indirectos de genes, entre estos, se encuentran los de los grupos sanguíneos A, B y O, Lewis y Secretor.

Cuando las células que se aglutinan son glóbulos rojos (eritrocitos) humanos, el fenómeno se denomina hemaglutinación. La distribución de los ligandos en la superficie de la membrana es diferente para cada aglutinina utilizada, lo cual depende de la afinidad y del sitio de unión específico. A medida que aumenta el poder aglutinante de la aglutinina, el aglutinado toma una forma esférica.

La mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, actuando a la misma dilución y por lo tanto no son específicas de grupo. Las específicas aglutinan eritrocitos humanos preferentemente de un determinado grupo sanguíneo. Esta especificidad permite usar a las lectinas como reactivo de tipificación de grupo sanguíneo y en la identificación de individuos secretores.

En este trabajo se estudió mediante el análisis de imágenes digitales, las dimensiones y características de los aglutinados formados por lectinas provenientes de la familia de las Fabáceas (leguminosas) que abundan en nuestra región como la *Medicago sativa* (alfalfa), *Acacia caven* (aromito), *Glycine max* (soja), *Albizia julibrissin*, *Anadenanthera colubrina* (cebil), *Parkinsonia aculeata* (cina-cina).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las lectinas

Las lectinas se prepararon de acuerdo con las recomendaciones de la American Association of Blood Banks, determinándose además su pH y osmolaridad.

Preparación de las muestras

Eritrocitos humanos normales, previamente lavados tres veces en buffer fosfato salino (PBS) (pH 7,4, 295 mOsm/kg), fueron incubados con las distintas soluciones de lectinas a temperatura ambiente durante

2 hs. Una gota de cada preparación fue depositada sobre un portaobjeto, previamente cubierto con albúmina sérica humana, para su observación.

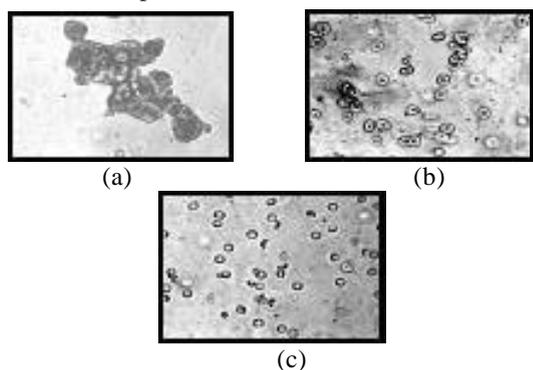


Figura 1: Imágenes mostrando tres situaciones diferentes debido al efecto de las lectinas sobre los glóbulos rojos: (a) aglutinado macroscópico, (b) aglutinado microscópico, (c) no aglutinación.

Sistema de medición

Los preparados se observaron en un microscopio invertido (National) con salidas para cámara de vídeo, cámara fotográfica y cámara polaroid (100x). Las imágenes se registraron mediante una Cámara CCD "frame grabber" (Sony XC-75) y se procesaron en una computadora equipada con sistema IPPlus de análisis digital de imágenes (Equipamiento Sony) y placa de adquisición y procesamiento⁴.

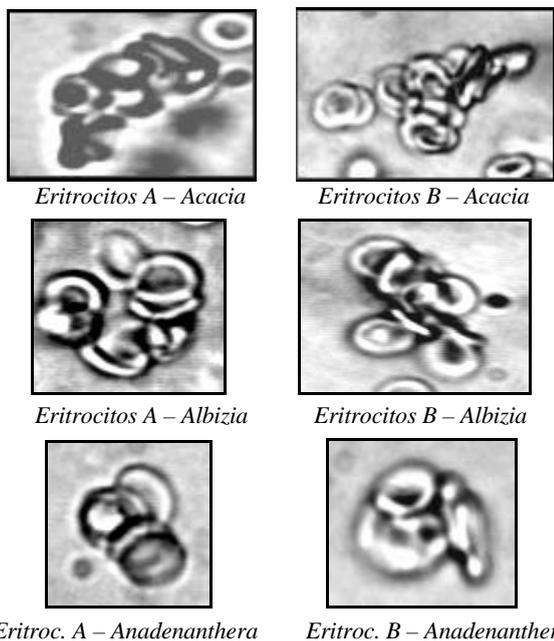


Figura 2: Imágenes mostrando distintos aglutinados microscópicos obtenidos para eritrocitos tipo A y tipo B, incubados con las lectinas Acacia, Albizia y Anadenanthera.

Parámetros determinados

Se midió el perímetro (P) y el área (A) de las imágenes de los distintos aglutinados obtenidas. Con estos valores se determinó el parámetro de aglutinación eritrocitaria (ASP)⁵ de la siguiente manera:

$$ASP = \frac{4 \cdot \pi \cdot A}{P^2}$$

De esta forma, el aglutinado cuya forma se aproxime más a la esférica, tendrá un valor de ASP mayor, siendo el máximo posible igual a 1 (correspondiente precisamente a una esfera). Por lo tanto un valor mayor de ASP indica una energía de adhesión mayor del antígeno de superficie para la correspondiente aglutinina.

III. RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 2 se muestran las imágenes correspondientes a las tres lectinas fabáceas que mostraron aglutinación.

En la tabla I se presentan los valores de ASP determinados por el procesamiento digital de las imágenes obtenidas.

TABLA 1: VALORES DE ASP OBTENIDOS CON ERITROCITOS HUMANOS TIPO A Y B PARA LAS DISITINTAS LECTINAS

TIPO DE LECTINA	GRUPO A		GRUPO B	
	Aglutina	ASP	Aglutina	ASP
<i>Medicago sativa</i>	no	-	no	-
<i>Acacia caven</i>	si	0,42	si	0,29
<i>Glycine max</i>	no	-	no	-
<i>Albizia julibrissin</i>	si	0,37	si	0,36
<i>Anadenanthera colubrina</i>	si	0,54	si	0,43
<i>Parkinsonia aculeata</i>	no	-	no	-
Germen de Trigo (control)	si	0,23	si	0,25

CONCLUSION

Si bien no existe evidencia macroscópica de aglutinación con las lectinas y condiciones analizadas, la observación de los preparados mediante un microscopio invertido permitió evidenciar y analizar aglutinados de distintas características. Los resultados obtenidos son de utilidad como un parámetro adicional del control de calidad, lo que permitiría, ajustando las condiciones de preparación de las lectinas, tales como concentración, pH y fuerza iónica, utilizarlas como reactivos hemoclasificadores en un laboratorio Inmunoematológico.

Referencias

- 1 – Goldstein, I.J., et al. Nature 285, 66 (1981).
- 2 – Sahron, N., Lis, H. Science, 177, 949-959 (1972).
- 3 – Salmon, C., Cartron, J., Rouger, P “Les groupes sanguins chez l’homme”. 2da edición (1991).
- 4 – Riquelme, B., Dumas, D., Valverde, J., Rasia, R., and Stoltz, J. Proceedings of SPIE (2003).
- 5 – Chen S. et al. Biorheology, 32(4), 487-496 (1995).