

ESTIMULACION IN VITRO DE LINFOCITOS UTILIZANDO DOS NUEVAS LECTINAS AISLADAS DE *Dioclea lehmanni* Y *Erythrina costaricensis*

por

Marta Lucía Bueno*, Mario Contreras-Vega* y Gerardo Pérez**

Resumen

Bueno, M.L., Contreras-Vega, M. & G. Pérez.: Estimulación invitro de linfocitos utilizando dos nuevas lectinas aisladas de *Dioclea lehmanni* y *Erythrina costaricensis*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 19 (73): 337-341, 1994. ISSN 0370-3908.

La actividad estimulante de linfocitos por las lectinas está relacionada con los glucósidos específicos a los que éstas se unen en la membrana celular. La composición de las membranas en las diferentes especies es particular por lo cual es posible detectar diversas respuestas ante lectinas que reconozcan azúcares diferentes. La lectina de *Erythrina costaricensis* logró transformar los linfocitos de *Proechimys chrysaеolus* en una concentración de 0.65 $\mu\text{g/ml}$, los de *Aotus l. griseimembra*, con 2.38 $\mu\text{g/ml}$ y los de humanos con 19.65 $\mu\text{g/ml}$. Las tres especies difieren significativamente en las concentraciones requeridas para obtener el pico máximo de transformación siendo éste siempre inferior al presentado en los cultivos controles con fitohemaglutinina y favina. La lectina P2 de *Dioclea lehmanni* no induce transformación en los linfocitos de los humanos ni en los de *Proechimys chrysaеolus*, observándose solamente estímulo en los de *Aotus l. griseimembra* en concentraciones de 1.34 $\mu\text{g/ml}$. Los datos presentados son intrigantes dada la similitud estructural de la Favina con las lectinas de *Erythrina*, teniendo en cuenta el reconocimiento funcional por los carbohidratos que caracterizan las lectinas. Se plantean algunas hipótesis para explicar estos resultados.

Palabras Claves: Lectinas, *Dioclea lehmanni*, *Erythrina costaricensis*, mitogénesis, linfocitos, *Aotus l. griseimembra*, *Proechimys chrysaеolus*.

Abstract

The *Erythrina costaricensis* transforms the *Proechimys chrysaеolus* lymphocytes at a concentration of 0.65 $\mu\text{g/ml}$, the *Aotus l. griseimembra* lymphocytes at 2.38 $\mu\text{g/ml}$ and human lymphocytes at 19.65 $\mu\text{g/ml}$. The three species differ in the concentrations required to reach maximal transformation; maximum stimulus is obtained with phytohaemagglutinin and favin. The *Dioclea lehmanni* P2 lectin stimulates only the *Aotus l. griseimembra* lymphocytes at a concentration of 1.34 $\mu\text{g/ml}$. Given the structural similarity of favin with the *Erythrina* lectins, the reported data are puzzling. Some hypothesis are laid down to explain the results.

Key Words: Lectins, *Dioclea lehmanni*, *Erythrina costaricensis*, mitogenesis, lymphocytes, *Aotus l. griseimembra*, *Proechimys chrysaеolus*.

* Laboratorio de Citogenética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fé de Bogotá, Colombia. Apartado 23227.

** Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, Colombia.

Introducción

Las lectinas son proteínas ampliamente distribuidas en microorganismos, plantas y animales (Kocourek, 1986; Lis y Sharon, 1986a,b). Dentro de las propiedades biológicas importantes de las lectinas están las de aglutinar eritrocitos humanos y animales, su citotoxicidad, la inducción de células supresoras, la actividad insulinomimética y la actividad mitogénica que presentan algunas de ellas. Nowell (1960), descubrió que los linfocitos, que eran considerados en ese tiempo como líneas terminales en su desarrollo, podían dividirse y desdiferenciarse cuando se cultivaban en presencia de lectinas. Desde entonces las lectinas han sido ampliamente empleadas en estudios inmunológicos y citogenéticos tanto básicos como aplicados.

Las más comunes son las extraídas de plantas, especialmente de las leguminosas (Kocourek, 1986). Para el estímulo de linfocitos humanos es muy utilizada la Fitoheماغlutinina (PHA) extraída de *Phaseolus vulgaris* que también ha sido empleada en algunos animales (Taylor y Siddiqui, 1978), aunque es poco activa en otras especies como mitógeno (Giraldo *et al.*, 1986; Bueno *et al.*, 1989).

Las lectinas difieren en su capacidad de estimular los linfocitos de distintas especies pero se piensa que todas tienen la capacidad de modificar la superficie celular e inducir la división si se emplea el sistema adecuado (Lis y Sharon, 1986a). Por nuestra experiencia en especies silvestres hemos podido observar que algunos ejemplares que no responden al estímulo con la PHA, presentaron buenos índices mitóticos con la lectina extraída de *Vicia faba* (favina).

La respuesta a agentes mitogénicos es muy específica y en algunos casos se ha encontrado que varía significativamente en grupos de especies muy cercanas o en segmentos poblacionales de una misma especie (Bryan y Hybertson, 1972).

El presente trabajo busca comparar la respuesta respecto a la actividad mitótica y los niveles de estimulación de los linfocitos de tres especies ante dos nuevas lectinas purificadas recientemente a partir de semillas de *Dioclea lehmanni* (P2) y *Erythrina costaricensis* (ECL) (Pérez *et al.*, 1990; Pérez, 1993b).

Materiales y métodos

Para la obtención de los linfocitos fueron usados como donantes tres especies distintas de animales: *Proechimys chrysaolus* (Rodentia: Echimyidae), *Aotus l. griseimembra* (Cebidae: Platyrrhini) y humanos.

Se efectuaron cultivos de sangre total, según Moorhead *et al.*, (1960) empleando siempre como control positivo un mitógeno que activara efectivamente los linfocitos de las especies escogidas. Para humanos se empleó PHA (GIBCO) a la concentración usada en los cultivos de rutina para estudios citogenéticos (7.5 μ g de liofilizado por ml de medio completo). Para *Aotus* y *Proechimys* el control positivo fue un extracto salino de *Vicia faba* preparado en el laboratorio en una dilución

previamente determinada por cultivos seriados en estas especies hasta obtener un pico máximo de respuesta al mitógeno (índices mitóticos entre 1.8% y 2.7%).

Los controles negativos fueron cultivos a los cuales no se adicionó ningún mitógeno. Los controles positivos también nos permitieron verificar las condiciones del medio de cultivo, ciclo celular y el tiempo de cosecha de células.

La evaluación de los índices mitóticos se obtuvo por conteo celular en láminas coloreadas con Giemsa, realizando la lectura con el objetivo de 10X, en 50 campos al azar por cada uno de los cultivos. El total de células se determinó por el número de células no transformadas, linfoblastos y células en mitosis (profásicas y metafásicas). Para cada uno de los cultivos el índice mitótico se calculó como la fracción: (número de metafases / número total de células) X 100.

Las lectinas de *Dioclea lehmanni* (P2) y *Erythrina costaricensis* (ECL) empleadas en estos cultivos fueron aisladas, purificadas y caracterizadas según Pérez *et al.*, (1990) y Pérez, (1993 b). La lectina ECL ha sido purificada por Nanne y Aragón (1991) por un método más complejo, por lo que éste no fue utilizado. Las proteínas puras se adicionaron a los cultivos según la especie, en diferentes concentraciones que en todos los casos fueron menores a la concentración que ocasionaba aglutinación de los eritrocitos.

Resultados y discusión

En los controles negativos en ningún caso se observó transformación blástica. Los controles positivos tanto con la PHA como con la favina presentaron índices muy superiores a los que se lograron con las dos nuevas lectinas, por lo que sus valores no pudieron ser incluidos en la figura.

En la Tabla 1 y en la Figura 1 se observan los resultados de los índices mitóticos (I.M.) obtenidos con la lectina de *Erythrina costaricensis* (ECL) para cada una de las especies. Esta lectina mostró un amplio rango de acción aunque con índices bajos de estimulación con respecto a los obtenidos en el control positivo.

De acuerdo con los resultados es claro, que las concentraciones en las cuales se obtienen los picos máximos de transformación, para cada una de las especies incluidas en este estudio, difieren significativamente. *P. crysaolus* responde pobremente a concentraciones bajas de proteína (0.65 μ g / ml de medio con IM de 0.33%), en tanto que *A. l. griseimembra* presenta una mejor transformación (I.M. 0.45%) en concentraciones un poco más elevadas (1.9 μ g de proteína por ml de medio) después de la cual se muestra un claro efecto inhibitorio. En humanos sólo se obtuvo transformación con los índices mitóticos más altos de las tres especies, en concentraciones superiores a 13.1 μ g/ml de medio.

El I.M. máximo observado con esta lectina fue de 0.61% en linfocitos humanos en una concentración de proteína de 26.2 μ g/ml de cultivo. El patrón de PHA en este experimento mostró un índice mitótico (I.M.) de

Tabla 1. Indices mitóticos obtenidos con la lectina de *Erythrina costaricensis*

Concentración (µg/ml)	A.l. <i>griseimembra</i>	Humanos	<i>P. chrysaеolus</i>
0.13	0	0	0
0.26	0	0	0
0.34	0	0	0
0.52	0	0	0
0.65	0.08	0	0.33
1.31	0.14	0	0.19
1.96	0.45	0	0.17
2.38	0.4	0	0
2.62	0.27	0	0
5.24	0.24	0	0
7.19	0.3	0	0
10.48	0.23	0	0
3.1	0	0.22	0
19.65	0	0.41	0
26.2	0	0.61	0
32.75	0	0	0
39.3	0	0	0

Tabla 2 . Indices mitóticos máximos obtenidos con la lectina de *Erythrina costaricensis* (ECL)

ESPECIE	E CL		CONTROL*
	I.M	µg/ml	I.M.
<i>P.chrysaеolus</i>	0.3	0.65	1.8
<i>A.l.griseimembra</i>	0.45	1.96	1.7
HUMANOS	0.61	26.2	2.2

* Para los controles de *P.chrysaеolus* y *A.l.griseimembra* se utilizó favina, para los humanos fitohemaglutinina.

Los ensayos realizados demuestran claramente la capacidad mitogénica de esta lectina para los linfocitos de las tres especies. Esta es menor que la producida por la fitohemaglutinina en los linfocitos humanos o por la favina en los linfocitos de primates y roedores.

La comparación de los datos obtenidos en este trabajo con los publicados para las lectinas aisladas de varias especies de *Erythrina* (Gilboa-Garber & Mizrahi, 1981; Iglesias *et al.*, 1982; Lis *et al.*, 1985; Peña *et al.*, 1988) muestran que ellas difieren significativamente entre sí en cuanto a su capacidad mitogénica frente a linfocitos humanos. En los casos en que se obtiene estímulo, las dosis para el máximo I.M. varían entre 33-100 µg lectina/ml de cultivo. Las diferencias observadas son intrigantes cuando se considera la alta similitud estructural y funcional que poseen entre sí las lectinas del género *Erythrina* (Pérez, 1993a).

Para las tres especies las concentraciones altas de proteína en el medio de cultivo provocaron aglutinación de los eritrocitos. No se realizaron las pruebas de aglutinación in vitro con eritrocitos lavados dado que esta propiedad había sido establecida en trabajos previos (Pérez *et al.*, 1990; Pérez, 1993b).

Los datos presentados sugieren también claras diferencias en la composición de las membranas de las tres especies. Si la respuesta mitogénica está correlacionada con el número de receptores (glicoproteínas) en las membranas, las diferencias en las concentraciones de proteína requeridas para la transformación de los linfocitos podría ser explicada por esta característica siempre y cuando la relación linfocito/ml:eritrocito/ml sea equivalente entre ellas. Otra posible explicación para estos resultados, serían las diferencias en la afinidad de estas proteínas por oligosacáridos particulares presentes en los receptores de los linfocitos.

Estos resultados son interesantes dado que conservan alguna proximidad entre las respuestas del primate con los humanos y una mayor diferencia con el roedor que corresponden a la proximidad evolutiva de las especies. Con la lectina de *Dioclea lehmanni* (P2) se obtuvieron resultados notablemente diferentes. Se cubrió un

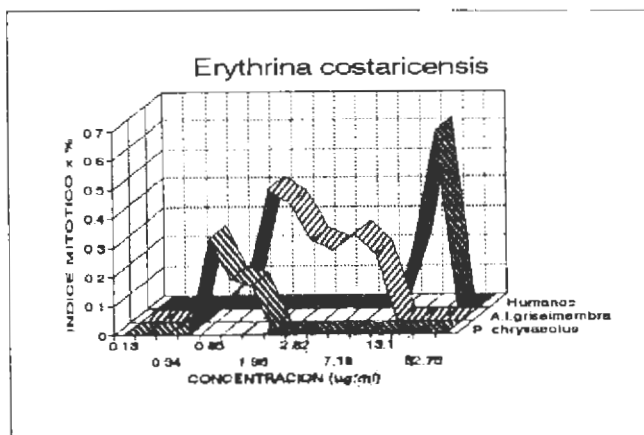


Figura 1. Índice mitótico de la lectina de *Erythrina costaricensis* para las tres especies estudiadas.

2.2% que es aproximadamente cuatro veces superior al encontrado con la ECL.

Para *Aotus l. griseimembra* el I.M. máximo con ECL fué de 0.45% para una concentración de proteína de 1.96 µg/ml de cultivo y en *P.chrysaеolus* de 0.19%. Al comparar estos valores con los de los controles realizados con favina, se puede ver que aunque se obtuvo estímulo, éste es también casi cuatro veces inferior al observado con la lectina control (favina, I.M. 1.7%).

rango mucho más amplio de concentraciones (no todos los ensayos se incluyen en la Tabla 3), desde 0.058 hasta 10.76 μg de proteína/ml de medio. Sólo se obtuvo transformación en los linfocitos de *A.l.griseimembra* con un I.M. máximo de 1.16% a una concentración final de 1.34 μg lectina/ml de cultivo. Este índice fue inferior al observado en el control con favina (I.M. 1.7 %) pero superior al encontrado con la lectina de *Erythrina costaricensis* (Tabla 4).

Tabla 3. Índices mitóticos obtenidos con la lectina de *Dioclea lehmanni*

CONCENTRACION ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	A.l. <i>griseimembra</i>
0.06	0.32
0.80	0.38
1.07	0.13
1.34	1.16
2.69	0.09
4.03	0
5.03	0

Tabla 4. Índices mitóticos obtenidos para *A.l. griseimembra* con las tres lectinas del presente trabajo.

LECTINA	$\mu\text{g}/\text{ml}$	I.M.
ECL	1.96	0.45
P3	1.34	1.16
Favina	0.07	1.7

En los cultivos de linfocitos humanos y de *Proechimys chrysaolus* estimulados con P2 el I.M. fue cero para todos los ensayos realizados, por lo que se concluye que esta proteína no es capaz de transformar los linfocitos de estas especies.

Al comparar los I.M. obtenidos en los linfocitos de *A.l. griseimembra* con las diferentes lectinas se observa que con la lectina de *Erythrina costaricensis* hay respuesta en un rango mucho más amplio aunque los índices mitóticos son más bajos que los obtenidos con la Favina. Con la lectina P2, se obtienen resultados intermedios en cuanto a concentración de proteína e índice mitótico.

Es posible que al trabajar con un extracto crudo de favina no se esté midiendo la capacidad mitogénica específica de una sola proteína sino de un complejo de proteínas que se encuentran en la *Vicia fava* y pueden estar presentando una acción sinérgica en la respuesta.

Desde el punto de vista citogenético, biológico y taxonómico los resultados presentados en este trabajo muestran unas interesantes líneas de aplicación de las

lectinas en su actividad diferencial de aglutinar los eritrocitos en diferentes animales, (Iglesias *et al.*, 1981) que pueden ser utilizadas para la diferenciación de especies o subespecies animales o para la diferenciación de estadios en el desarrollo de *Leishmania donovani* (Wilson y Pearson, 1984).

En los vertebrados son pocos los trabajos que se han realizado en este sentido pero se tienen datos como los presentados por Taylor y Siddiqui, (1978), en los que se muestran respuestas diferenciales de los linfocitos de diferentes poblaciones de *Aotus* frente a fitohemaglutinina, mitógeno de *Phytolacca americana* y Concanavalina A. Estas diferencias han sido utilizadas como evidencia por los taxónomos para proponer que este género no es monoespecífico (Herskovitz, 1983).

Agradecimientos

Los autores agradecen a las secciones de Genética y Bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS), por facilitar las instalaciones y el material biológico. Igualmente expresan sus agradecimientos al Departamento de Química (U.Nacional) por el apoyo prestado para realizar este trabajo.

Bibliografía

- Bryan, J.H.D. & R.L. Hybertson. 1972. The in vitro stimulation of lymphocytes from peripheral blood and lymph nodes of the laboratory mouse. *Cytogenetics* 11: 25-34.
- Bueno M.L., M. Gómez-Laverde & A. Morales. 1989. Caracterización cariológica de *Proechimys sp.* (Rodentia: Echimyidae) de una colonia experimental. *Biomédica* 9: 13-22.
- Gilboa-Garber, N & L. Mizrahi. 1981. A new mitogenic D-galactosephilic lectin isolated from seed of coral tree *Erythrina corallodendron*. Comparison with *Glycine max* (Soybean) and *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *Can. J. Biochem.* 59: 315-320.
- Giraldo, A., M.L. Bueno & E. Silva. 1986. Estudio citogenético de 288 *Aotus* Colombianos. *Biomédica* 6: 5-13.
- Herskovitz, P. 1983. Two new species of night monkeys, genus *Aotus* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report on *Aotus* taxonomy. *Am.J.Prim.* 4: 209-243.
- Iglesias, J. L., H. Lis & N. Sharon. 1982. Purification and properties of D-galactose / N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Erythrina cristagalli*. *Eur. J. Biochem.* 123: 247-253.
- Kocourek, J. 1986. Historical Background. In: Liener, I.E., Sharon, N. and I.J. Goldstein (eds.) *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*: Academic Press, New York, pages 3-32.
- Lis, H. & N. Sharon. 1986a. Applications of Lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N. and I.J. Goldstein (eds.) *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*: Academic Press, New York, pages 294-370.
- _____ & N. Sharon. 1986b. Biological Properties of Lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N. and I.J. Goldstein (eds.) *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*: Academic Press, New York, pages 266-293.
- _____, J.F. Joubert, & N. Sharon. 1985. Isolation and properties of N-acetyllactosamine-specific lectins from nine *Erythrina* species. *Phytochemistry* 24: 2803-2809.
- Moorhead, P.S., P.C. Nowell, W.J. Mellman, D.M. Battips & D.A. Hungerford. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp.Cell.Res.* 20: 613-616.

- Nanne, C.I. & F. Aragón. 1991. Aislamiento, purificación y caracterización de una lectina de la semilla del poró, *Erythrina costaricensis* (Leguminosae). *Rev.Biol.Trop.*, **39**: 15-21.
- Nowell, P.C. 1960. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* **20**: 462-466.
- Peña C., F. Villarraga & G. Pérez. 1988. A lectin from the seeds of *Erythrina rubrinervia*. *Phytochemistry* **27**: 1045-1048.
- Pérez G. 1993a. *Erythrina* lectins-A review. Structural and physicochemical properties. *Rev.Acad. Col. Ciencias* **18**: 545-553.
- Pérez G. 1993b. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina costaricensis* (en prensa).
- Pérez, G., M. Hernández & E. Mora. 1990. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. *Phytochemistry* **29**: 1745-1749.
- Taylor, D.W. & W.A. Siddiqui. 1978. Comparative mitogen responses of lymphocytes from Colombian, Panamanian, and Peruvian owl monkeys. *Lab. Ann. Sc.* **28**: 567-574.
- Wilson M.E. & R.D. Pearson. 1984. Stage specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. *Infect.Immunol.* **46**: 128-134.