

EXTRACTOS VEGETALES DE ESPECIES CHILENAS COMO POSIBLES MARCADORES GENETICOS EN ERITROCITOS DE GALLINAS

P O B

FARUK ALAY H. (*) y MAGALIS BITTNER B. (**)

RESUMEN

Se prueba la capacidad hemoaglutinante de 15 extractos vegetales frente a 27 muestras de glóbulos rojos de gallinas.

Un 6.6% de estos extractos no presentan capacidad hemaglutinante.

Un 20% se comporta como Lectinas inespecíficas o fitohemoaglutininas (F.H.A.).

Un 73.4% de los extractos son capaces de discriminar en la población de glóbulos rojos examinada. Se discute la existencia de Lectinas específicas en ellos y su posible utilización como marcadores genéticos.

ABSTRACT

To detect the existence of Lectins, extracts of 15 Chilean plants were tested against 27 chicken's erythrocytes samples.

6.6% of the extracts were negativ.

20% Have inespecific Lectins (Phytohemagglutinins or phytoagglutinins).

73.4% discriminate different kinds of erythrocytes in the red blood cells examined population. The possibility to use this group as genetic markers is discussed.

INTRODUCCION

Se sabe que algunos extractos vegetales presentan la propiedad de aglutinar específica e inespecíficamente los glóbulos rojos de numerosos vertebrados (Nathan Sharon et al. 1972). A la sustancia responsable de dicha acción y presente en los extractos, se la designó en un comienzo como Fito-hemoaglutinina (F.H.A.) o Fitoaglutinina.

(*) Departamento de Biología Celular, Instituto de Biología "Ottmar Wilhelm", Universidad de Concepción.

(**) Departamento de Botánica, Instituto de Biología "Ottmar Wilhelm" Universidad de Concepción.

Actualmente dicho nombre ha sido sustituido por el de Lectinas (W.C. Boyd et al, 1954), algunas no específicas o panaglutininas (F.H.A.) y otras, Lectinas específicas, de éstas últimas algunas han sido purificadas y aisladas (Concanavalina A, Ricina etc.) (Kabat et al 1961).

El grupo de Lectinas específicas es de interés debido a que existen algunas que aglutinan específicamente los glóbulos rojos humanos de Grupo A, A₁, B, M, N, y H (W.C. Boyd, 1970). La especificidad se debería a la capacidad que presentan estas Lectinas de unirse al determinante antigénico presente en la superficie del glóbulo rojo (Nathan Sharon et al, 1972); de ahí que puedan ser utilizadas como marcadores genéticos.

Existe poca información respecto a la acción que los extractos vegetales puedan ejercer sobre los glóbulos rojos de aves domésticas. Solamente se ha descrito la acción de extractos de *Phaseolus vulgaris* que identifica específicamente el antígeno designado como "Hi" (S. L. Scheinberg et al, 1962; S. L. Scheinberg et al, 1961), presente en la superficie del eritrocito de gallinas y que de acuerdo a algunos autores (E. Petrovsky et al, 1970) es un marcador genético fisiológico.

La posibilidad de utilizar estos extractos como marcadores genéticos ofrece una serie de perspectivas desde el punto de vista de la Genética básica (relación entre gen y carácter) así como de Genética aplicada (poblacional, mejoramiento animal, etc.). De ahí que consideráramos de interés investigar la posible existencia de Lectinas específicas en los extractos de vegetales chilenos elaborados en el Laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Biología, "O. Wilhelm" de la Universidad de Concepción, con el objeto de comprobar su existencia y en el futuro hacer extensivo este tipo de estudios a otras especies de vertebrados.

MATERIALES Y METODOS

En la presente comunicación utilizados 15 extractos, designados en lo sucesivo por un número y que se obtuvieron a partir de las siguientes especies:

Nº	Nombre de la planta
4	<i>Francoa sonchifolia</i> Cav
29	<i>Drimys winteri</i> Forst
47	<i>Phyla nodiflora</i> (L.)
53	<i>Crinodendron hookerianum</i> Gay
64	<i>Encelia canescens</i> Lam
66	<i>Maytenus boaria</i> Mol
68	<i>Myrceugenia exsuca</i> (DC.) Berg
75	<i>Senecio yegua</i> (Colla) Cabr
83	<i>Jovellana violaceae</i> (Cav.) Don

84	<i>Chorizanthe glabrescens</i> Benth
88	<i>Haplopappus parvifolius</i> (DC.) Gray
91	<i>Fuchsia magellanica</i> Lam
43	<i>Lomatia hirsuta</i> (Lam.) Diels
96	<i>Escallonia illinita</i> Presl
31	<i>Lobelia tupa</i> L.

Estos extractos fueron enfrentados con los glóbulos rojos de 27 gallinas procedentes del Vivero del Laboratorio de Genética.

Utilizamos la técnica de hemoaglutinación en tubo con lectura macro y microscópica, teniendo cada reacción un control positivo mediante un isoantisuero inespecífico elaborado previamente y un control negativo constituido por glóbulos rojos en solución salina isotónica.

Los extractos se prepararon de acuerdo a la técnica de Boyd y se conservaron en refrigeración (W.C. Boyd et al, 1954). Se utilizaron sin dilución.

La sangre se obtuvo por punción de la vena alar. Utilizamos citrato de sodio como anticoagulante.

Los eritrocitos se lavaron cuidadosamente para eliminar la presencia de plasma ya que los azúcares pueden inhibir la capacidad de reacción de las Lectinas.

Las lecturas de las reacciones se hicieron después de agitación vigorosa, ya que algunas se adhieren al fondo del tubo dificultando la lectura.

Fueron clasificadas como sigue:

- +++ Grumos grandes
- ++ Grumos medianos
- + Grumos pequeños

Ensayos de titulación de los extractos (ver Cuadro N° 1) nos revelaron que un 60% de ellos reacciona en dilución 1:4 (++) . Esto indica que su concentración en Lectinas específicas o inespecíficas es considerable.

La mayoría de los extractos son coloreados. Este hecho unido a una reacción débil dificultan la lectura, de ahí que se prefirió utilizarlos sin dilución.

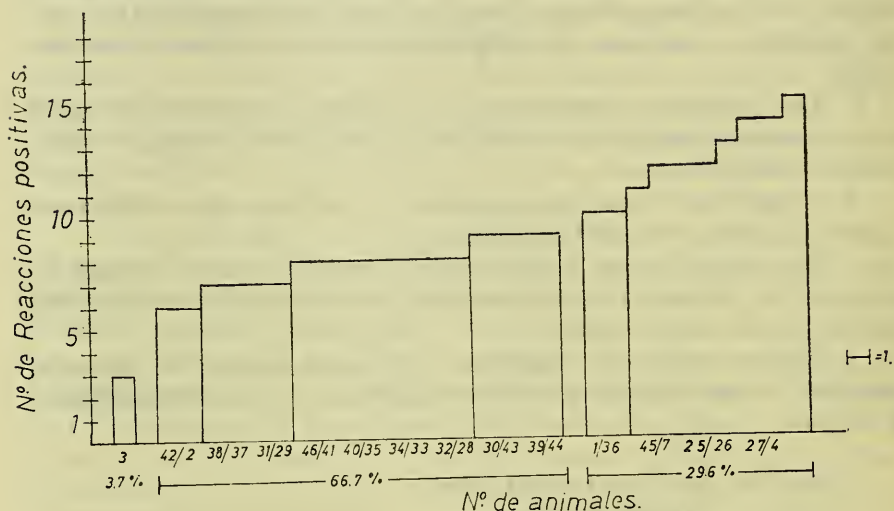
RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro N° 2 se aprecia el total de las reacciones realizadas. Se puede ver que en relación a las gallinas examinadas distinguimos dos grandes grupos: Uno formado por el 66.7% de los animales (Ver además Cuadro N° 3) en que el número de reacciones positivas fluctúa entre 6 y 9 por gallina.

Cada animal reacciona de una manera particular frente a los extractos.

El segundo grupo está constituido por el 29.6% de la población examinada. Son animales que reaccionan con 10 o con la totalidad de los extractos (15).

CUADRO N° 3
 NUMERO DE AGLUTINACIONES POSITIVAS INDUCIDAS POR LOS
 EXTRACTOS VEGETALES UTILIZADOS



Finalmente hay un grupo formado por un 3.7% de los animales que reacciona escasamente.

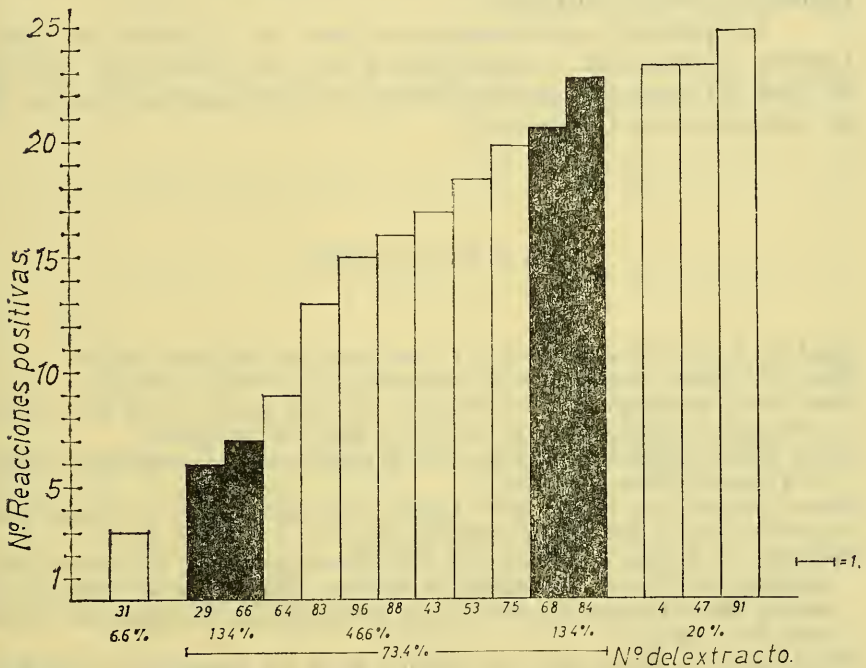
En el Cuadro N° 4 se analiza el comportamiento de los extractos. El extracto N° 31 (6.6%) carece prácticamente de Lectinas a diferencia de los números 4-47-91 (20%) que se comportan como Lectinas inespecíficas o panaglutininas (F.H.A.), es decir aglutinan prácticamente a la totalidad de las 27 muestras de glóbulos rojos.

El resto de ellos (73.4%) son capaces de discriminar entre los distintos componentes de la población de glóbulos rojos examinada.

Los resultados anteriores parecen indicar que de los extractos estudiados, un grupo considerable de ellos (73.4%) aparentemente tienen Lectinas específicas. Como ejemplo de esto se cita el caso de la gallina N° 41 que reaccionó intensamente frente al extracto N° 68 (Ver Cuadro N° 2) en cambio la número 46 es negativa. El principio activo del extracto N° 68, estaría detectando una estructura presente sólo en los glóbulos rojos de la gallina N° 41 y no en los de la N° 46. Ejemplos semejantes se encuentran dentro de este grupo.

Es interesante el comportamiento de dos parejas de extractos N° 29-66 y 68-84). Cada pareja se comporta de una manera similar frente a las distintas muestras de glóbulos rojos (ver Cuadros N.os 2 y 4). Pensamos que esta similitud de comportamiento se debe a que cada pareja presenta el mismo principio activo, siendo éstos distintos. Este fenómeno no tiene una explicación filogenética, ya que se trata de especies distintas (*Drymis* y *Maytenus* - *Myrceugenia* y *Chorizante*). Esto coincide con lo observado por otros autores (Nathan Sharon et al, 1972; W.C. Boyd, 1970).

CUADRO N° 4
 NUMERO DE AGLUTINACIONES POSITIVAS INDUCIDAS EN LA
 POBLACION DE GALLINAS EXAMINADAS



La importancia de los extractos vegetales como herramienta de uso en Genética es considerable, sin embargo creemos que la limitación más importante que presentan es su impureza. En relación a esto hay opiniones contradictorias, algunos (Nathan Sharon et al, 1972) piensan que si bien es deseable usar en la tipificación sanguínea Lectinas altamente purificadas, los extractos crudos son igualmente adecuados para este propósito. Sólo muy escasamente un mismo extracto contiene dos o más Lectinas con distinta especificidad de grupo sanguíneo.

La existencia de otros factores capaces de inducir aglutinación inespecífica de los eritrocitos (presencia de iones metálicos, algunos

aditivos, impurezas de otro tipo, etc.) hacen que se piense que lo más adecuado sea purificar los extractos aislando el o los principios activos que contengan, ya sea recurriendo a técnicas de química de proteínas o mediante absorción serológica (W.C. Boyd, 1963). Este último método presenta para estos casos, limitaciones (Nathan Sharon et al, 1972).

Finalmente otro recurso de seguridad en el manejo futuro de los extractos será comparar, a semejanza de lo que se hace actualmente en la práctica hematológica humana (W.C. Boyd et al, 1954), la respuesta de sueros antieritrocitarios monoespecíficos isólogos o heterólogos con la respuesta de los extractos que se prueben con la finalidad de reemplazar antisueros que en el caso de las especies animales son de muy difícil obtención debido a su complejidad. Esta última posibilidad está siendo analizada.

La presente comunicación es parte del Proyecto de Investigación denominado Inmunogenética de aves domésticas (Código N° 2.08.11) financiado por el Consejo de Investigación Científica de la Universidad de Concepción.

BIBLIOGRAFIA

- Boyd, W. C. 1970. Lectins. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 169, Art: 168-190.
Boyd, W.C. 1963. Fundamentos de Inmunología. Ed. Eudeba, 159-160.
Boyd, W.C.; Shapleigh, E. 1954. Diagnosis of blood group A and B by use of plant agglutinins (Lectins). J. Lab. Clin. Med. Vol. 44:235-237.
Kabat, Elvin A., Mayer, Manfred M. 1961. Experimental Immunochemistry. Charles C. Thomas Publisher: 826-829.
Sharon, Nathan, Lis, Halina. 1972. Lectins: Cell agglutinating and sugarspecific proteins. Science Vol. 177 N° 4053:949-959.
Petrovsky, E.; Mácha, J.; Soutorová, J. 1970. Blood groups and Biochemical Polymorphism in different populations of chickens. XIth European Conference in Animal Blood Groups and Biochemical Polymorphism. Warsaw. Ed. Netherland Press 398-401.
Scheinberg, S.L.; Reckel, R.P. 1962. Studies of the Hi agglutininogen in chickens. Ann. N.Y. Acad. Sci. Vol. 7 Art. 1:194-204.
Scheinberg, S.L.; Reckel, R.P. 1961. Effects of oestrogen on somatic variations of an erythrocyte agglutininogen in chickens Nature. Vol. 189, N° 4761:295-296.

CUADRO N° 2
REACCIONES ENTRE ERITROCITOS DE GALLINA Y EXTRACTOS VEGETALES

Glóbulos Rojos N°	Extractos N.ºs																Total Aglut. x animal
	31	29	66	64	83	96	88	43	53	75	68	84	4	24	24	25	
4	+	++	+	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+	++	++	15
26	—	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	14
27	—	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	14
25	+	++	++	—	++	++	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++	13
7	+	—	+	—	++	++	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++	12
45	—	—	±	—	++	++	++	—	++	++	++	++	++	++	++	++	11
1	—	++	—	—	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	10
96	—	—	—	++	++	++	++	+	++	++	++	±	++	++	++	++	10
30	—	—	—	++	—	++	++	++	—	—	++	++	++	++	++	++	9
34	—	—	—	++	—	++	++	++	—	—	++	++	++	++	++	++	8
35	—	—	—	++	—	++	++	++	—	—	++	++	++	++	++	++	8
43	—	—	—	—	++	++	++	—	++	++	—	++	++	++	++	++	9
41	—	—	—	—	++	++	±	—	++	++	++	±	++	++	++	++	8
46	—	—	—	—	++	++	±	—	++	++	—	++	++	++	++	++	8
39	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	9
38	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	8
40	±	—	—	—	—	—	—	++	++	++	±	—	++	++	++	++	7
40	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	8
28	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	8
37	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	7
44	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	±	++	++	++	++	++	9
29	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	7
33	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	8
32	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	++	++	++	++	8
31	—	—	—	—	—	—	—	++	++	++	++	++	±	++	++	++	7
2	—	+	+	±	+	—	—	±	—	—	—	+	±	—	—	—	6
42	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	+	—	—	—	—	6
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—	3

Total aglut. x extracto	3	6	7	9	13	15	16	17	19	20	21	23	24	24	25	242
	3	6	7	9	13	15	16	17	19	20	21	23	24	24	25	242

CUADRO
TITULACION DE LOS

Glóbulos Rojos N ^o	Extractos N.os											
	N	64 ½	¼	N	88 ½	¼	N	96 ½	¼	N	43 ½	¼
24	+++	++	±	+++	++	—	+++	++	+	+++	++	+
22	+++	++	—	++	++	++	+++	++	+	+++	++	+
11	+++	++	+	++	+++	+	++	++	+	+	+	+
2	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	±	+	—
3	++	++	++	—	—	+	—	—	+	—	—	—
4	++	++	+	+++	++	+	++	+	+	+	—	—
7	—	+	—	+	—	—	+	—	—	—	+	—
1	—	±	—	++	+	—	+++	++	—	—	±	—
25	—	±	—	++	+	—	+++	+	—	—	—	—
26	+	++	+	+++	+	—	+++	++	+	+++	+	—
27	+	++	+	+++	+	—	+++	++	+	++	+	—

Glóbulos Rojos N ^o	Extractos N.os											
	N	66 ½	¼	N	84 ½	¼	N	91 ½	¼	N	4 ½	¼
2	+	+	+	+	—	—	—	+	—	—	++	+
3	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
4	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+++	++	++
7	+	++	+	++	+	—	+	+	+	++	++	+
1	—	—	—	+++	++	+	++	+	—	++	+	+
25	++	+	—	+++	+	—	++	±	—	++	++	±
26	++	+	+	+++	++	+	+++	+	±	++	+	±
27	++	+	+	+++	++	—	+++	++	±	+	+	—

Nº 1
EXTRACTOS VEGETALES

Extractos N.os											
29			75			31			68		
N	½	¼	N	½	¼	N	½	¼	N	½	¼
+	±	—									
+	±	—									
+	±	±									
+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—
—	—	—	+	—	—	—	—	—	±	—	—
++	—	—	+	+	—	+	—	—	+++	++	+
—	—	—	+	+	+	+	—	—	+++	++	++
+++	++	—	+++	+	—	—	—	—	++	+	—
++	—	—	++	—	—	—	—	—	++	+	—
+++	+	—	+++	++	+	—	±	—	+++	—	—
+++	++	—	++	++	—	—	—	—	+++	++	—

Extractos N.os								
47			53			83		
N	½	¼	N	½	¼	N	½	¼
—	—	—	—	+	±	+	±	—
—	—	—	—	—	—	++	++	—
+++	+++	++	++	++	++	++	++	+++
+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
+++	++	+	+++	+	—	—	—	—
+++	++	—	+++	+	—	+++	+	—
+++	++	—	+++	+	—	+++	++	—
+++	++	±	+++	++	—	+++	++	+