

Producción

Laboratorios BETERA

ESTUDIO DE LA FITOHEMAGLUTININA PROVENIENTE DEL FRIJOL COLORADO (*PHASEOLUS VULGARIS*)

Lic. Patricia Hernández Díaz, Lic. Odalys Martín González, Lic. Yoryelín Rodríguez de Pablos Vélez y Dr. C. Félix A. Ganen Báez

RESUMEN

Se obtuvieron preparaciones crudas de fitohemaglutinina (PHA) a partir de frijol colorado (*Phaseolus vulgaris*) por 2 métodos: extracción acuosa y extracción ácida. Por el método ácido se obtuvieron mejores resultados en cuanto a concentración de proteínas y pureza de la misma. Se empleó la cromatografía en hidroxapatita para separar las isoformas que forman la PHA y se obtuvieron 5 fracciones proteicas que se evaluaron funcionalmente junto con las preparaciones crudas, a través de sus propiedades eritroaglutinantes y leucoaglutinantes. A medida que se aumentó la fuerza iónica del medio se observó que las fracciones obtenidas presentaban una disminución relativa de la actividad leucoaglutinante, así como un incremento relativo de la actividad eritroaglutinante. Las preparaciones crudas y las fracciones se evaluaron electroforéticamente y se obtuvieron bandas muy similares a la de la PHA patrón utilizada.

Descriptor DeCS: FITOHEMAGLUTININAS.

La fitohemaglutinina (PHA) se obtiene a partir de diferentes variedades de frijol pertenecientes a la especie *Phaseolus vulgaris*. Es una proteína que presenta una potente actividad mitogénica que también es capaz de aglutinar distintos tipos de células, tales como eritrocitos y leucocitos.¹⁻³

La PHA está constituida por una mezcla de 5 isolectinas tetraméricas (L4, L3E, L2E2, LE3 y E4) con propiedades biológicas diferentes, las cuales están formadas por varias combinaciones de 2 subunidades L y E. La isolectina L4 tiene

una actividad mitogénica y leucoaglutinante potente, sin embargo, no presenta actividad eritroaglutinante, mientras que la E4 tiene actividad eritroaglutinante muy fuerte pero no muestra actividad leucoaglutinante. Las isolectinas restantes, L3E2 y LE3, presentan actividad leucoaglutinante y eritroaglutinante proporcionales a las cantidades de subunidades E y L.^{4,5}

El objetivo de este trabajo es la obtención de preparados de PHA a partir del frijol colorado mediante 2 métodos

diferentes de extracción, así como el estudio preliminar de la separación y evaluación biológica de sus isoformas.

MÉTODOS

Se utilizó frijol colorado (variedad "Cueto") de alta calidad suministrado por INIFAT. Se emplearon 2 métodos de extracción en paralelo para obtener la fitohemaglutinina mezcla (PHA-M).

Método 1: extracción acuosa y precipitación salina.⁶

Se tomaron 100 g de harina de frijol y se sometieron a extracción en frío en 500 mL de agua destilada. Luego se realizó una precipitación ácida con ácido clorhídrico (HCl) 5 M hasta pH = 4,6 y se centrifugó a 3 000 rev/min durante 30 min a 4 °C.

Al sobrenadante se le reajustó el pH hasta la neutralidad y se realizó una precipitación salina con (NH₄)₂SO₄ al 60 %.

Método 2: combinación de extracción ácida con 2 precipitaciones salinas (Laboratorio Central de la Defensa Civil: Informe Técnico sobre Método de Obtención de Fitohemaglutinina, 1996).

Se tomaron 100 g de harina de frijol y se realizó una extracción en frío en 100 mL de HCl 0,1 N. Posteriormente se centrifugó a 3 000 rev/min durante 30 min a 4 °C y al sobrenadante obtenido se le realizó una precipitación salina fraccionada con (NH₄)₂SO₄ al 15 y 80 %, respectivamente.

En ambos métodos el precipitado final se resuspendió en agua destilada y se dializó contra la misma en una relación 1/5. El producto final se clarificó en un equipo de filtración Sartorius.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Macart, con la utilización del reactivo azul de Coomassie.⁷

La separación de las isoformas se realizó empleando una columna 10 cm de hidroxiapatita (CENIC),⁸ en la que se aplicaron 10 mL del extracto de PHA-M

equilibrado con solución amortiguadora de fosfato (Na₂HPO₄, 0,005 M/NaCl 0,1 M; pH = 6,8). Para la elución de las fracciones se empleó un flujo continuo de 0,5 mL/min con un gradiente discontinuo de fuerza iónica creciente de solución amortiguadora de fosfato. Cada fracción se monitoreó a 280 nm con un registrador acoplado a un cromatógrafo líquido (FPLC). Se concentró por ultrafiltración en AMICON 8050 (membrana YM-30). La concentración de proteínas totales se determinó antes y después de la ultrafiltración.

La evaluación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida con SDS a la PHA-M, a la PHA-M patrón y a las 5 fracciones obtenidas por cromatografía en hidroxiapatita. Se empleó una PHA-M patrón comercial de la DIFCO de 1 mg/mL de concentración y colorante Coomassie blue R-250 como revelador.

La actividad biológica de las muestras se evaluó a través de su actividad leucoaglutinante y eritroaglutinante. Esta última se estudia mediante diluciones seriadas de eritrocitos O Rh D positivo al 2 %, incubados a temperatura ambiente durante 1 h. Se observó la reacción de aglutinación macro y microscópicamente según la técnica de Rigas y Osgood.⁶

Los leucocitos de sangre periférica se aislaron por un gradiente Ficoll-Hypaque (d = 1,077 g/mL). La actividad leucoaglutinante se clasificó de acuerdo con el método de Lenier y otros.⁹

RESULTADOS

En la tabla 1 se presenta el comportamiento de las proteínas totales extraídas por los 2 métodos empleados y los estadígrafos media y desviación estándar para ambos métodos; mientras que en la tabla 2 se muestran los valores de concentración de proteínas y proteínas totales tanto de ambos extractos, como de

las fracciones correspondientes a los picos cromatográficos.

Los resultados electroforéticos de la PHA-M, así como de las fracciones obtenidas por ambos métodos, muestran una banda entre los 125 y 138 KD que coincide con la de la proteína intacta (patrón de la DIFCO). En el caso de la PHA-M obtenida por el método 1 se presenta otra banda en los 96 KD, que no está presente en la PHA-M obtenida por el método 2.

TABLA 1. Valores de proteínas totales correspondientes a cada método de extracción

Experimento	Valores de proteínas totales (mg)	
	Método 1	Método 2
1	510,5	1 022
2	500,0	1 025
3	508,4	1 065
4	500,0	1 035
5	502,0	1 055
	504,1 ± 4,85	1 040,4 ± 18,86

Media ± desviación estándar.

TABLA 2. Valores de concentración de proteínas y proteínas totales de la PHA-M de ambos métodos y de las fracciones correspondientes

Muestra	Volumen (mL)	Concentración de proteínas (mg/mL)	Proteínas totales (mg)
Fracción 1	9,00	0,57	5,13
Fracción 1'	7,00	0,48	3,47
Fracción 2	13,60	4,24	57,70
Fracción 3	21,00	0,93	19,53
Fracción 4	11,50	0,59	6,78
PHA-M1	10,00	10,53	3,50
Fracción 1	10,70	0,71	7,60
Fracción 1'	11,00	0,67	7,37
Fracción 2	12,50	4,86	60,75
Fracción 3	19,90	0,68	13,53
Fracción 4	12,50	0,74	9,25
PHA-M2	10,00	10,40	104,00

Las fracciones cromatográficas obtenidas a partir de la PHA-M procedentes de los métodos 1 y 2 presentan bandas electroforéticas entre 30 y 33 KD correspondientes con el peso molecular de las subunidades de la PHA.¹⁰

La actividad eritroaglutinante de la PHA-M en ambos métodos coincide con la

PHA-M patrón (1/512), las fracciones 1,1' y 2 no presentaron actividad, mientras que las fracciones 3 y 4 presentaron eritroaglutinante de 1/256 en los 2 métodos analizados (tabla 3).

La actividad leucoaglutinadora de las PHA-M obtenidas por ambos métodos fue similar a la del patrón (1+) y la de las fracciones correspondientes a los picos 1,1' fue mayor (2+ ó 3+) que la de los últimos 3 y 4 (1+ ó +/-) en los 2 métodos empleados (tabla 4).

DISCUSIÓN

Los valores que se observan en la tabla 1 evidencian que el método de extracción 2 posee un rendimiento en proteínas totales de casi el doble que el método 1, por lo que es más efectivo para la extracción de esta proteína.

Desde el punto de vista de la composición cualitativa de las isolectinas, no parece que haya diferencia entre ambos métodos, por la similitud que presentan los cromatogramas de los extractos. En ellos se obtuvieron 4 picos como informó *Lagomasino* (obtención de la PHA-L a partir de PHA-M mediante hidroxapatita. Informe Técnico 85-IL-03 del Departamento de Bioquímica del Instituto de Nefrología, 1985: 3-11). El pico 1 en ambos casos presenta un hombro en la parte interior (que denominamos pico 1'), lo que indica la presencia de otra proteína que eluye con un tiempo de retención casi idéntico que el primero, por lo cual se colectaron de forma independiente para su estudio (fracción 1 de 1').

Leavitt y otros¹⁰ comunicaron 5 picos correspondientes a 5 isolectinas obtenidas por medio de una combinación de cromatografía de afinidad con intercambio iónico. A nuestro juicio, una modificación

TABLA 3. Actividad eritroaglutinadora de la PHA-M y sus fracciones correspondientes obtenidas por los métodos de extracción 1 y 2

Muestra	Puro	Diluciones dobles de las muestras vs. eritrocitos al 2 %									
		2	3	8	16	32	64	128	256	512	1 024
PHA-M patrón	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	1+	+/-	0
PHA-M1	4+	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	+/-	0	
Pico 1	0										
Pico 1'	0										
Pico 2	2+	1+	0								
Pico 3	4+	4+	3+	2+	1+	+/-	0				
Pico 4	4+	4+	4+	3+	3+	2+	1+	+/-	0-		
PHA-M2	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	2+	1+	0
Pico 1	0										
Pico 1'	2+	+/-	0								
Pico 2	4+	3+	2+	+/-	0						
Pico 3	4+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	1+	0		
Pico 4	4+	4+	4+	3+	3+	2+	2+	2+	+/-	0	

TABLA 4. Actividad leucoaglutinante de la PHA-M y sus fracciones correspondientes obtenidas por los métodos de extracción 1 y 2

Muestra	Actividad leucoaglutinante
PHA-M patrón	1+
PHA-M1	1+
Pico 1	2+
Pico 1'	3+
Pico 2	2+
Pico 3	1+
Pico 4	+/-
PHA-M2	1+
Pico 1	2+
Pico 1'	3+
Pico 2	2+
Pico 3	1+
Pico 4	+/-

en el sistema de elución inicial en la cromatografía empleada nos permitirá obtener una mejor separación de las fracciones 1 y 1'.

La cantidad de proteínas totales (tabla 2) del conjunto de fracciones obtenidas es ligeramente superior para el método 2, lo que resulta ser una consecuencia de la mayor extracción obtenida por éste.

La ausencia de la banda electroforética en los 96 KD para la PHA-M obtenida por el método 2 en relación con el método 1, se debe probablemente a que el método 2

incluye una precipitación previa que puede eliminar otras proteínas contaminantes.

Los resultados obtenidos en cuanto a la actividad eritroaglutinante y leucoaglutinante en ambos métodos indican que las fracciones 1 y 1' contienen las mayores concentraciones de las subunidades isofórmicas L, mientras que las 3 y 4 contienen las mayores concentraciones de E, lo que está de acuerdo con los datos publicados por otros autores.¹¹ No obstante, se debe modificar el sistema de elución utilizado en la cromatografía en hidroxapatita, con el objetivo de mejorar la resolución en la separación de las fracciones 1 y 1'.

La PHA-M obtenida a partir de los 2 métodos empleados resultó adecuada para ser utilizada en el estudio de las isoformas de la fitohemaglutinina, sin embargo, el método de extracción 2 fue superior al 1 en cuanto a rendimiento en proteínas totales y pureza de la PHA-mezcla obtenida, por lo que desde el punto de vista práctico es más conveniente utilizar el método de extracción 2 para el estudio de las isoformas de la fitohemaglutinina.

SUMMARY

Raw preparations of phytohemagglutinin (PHA) were obtained from red bean (*Phaseolus vulgaris*) by 2 methods: aqueous extraction and acid extraction. Better results were obtained with the acid methods as regards the protein concentration and its purity. Hydroxyapatite chromatography was used to separate the isoforms forming the phytohemagglutinin. 5 protein fractions were obtained and functionally evaluated together with the raw preparations through their erythroagglutinating and leukoagglutinating properties. As the ionic force of the medium increased it was observed that the fractions obtained presented a relative decrease of the leukoagglutinating activity as well as a relative rise of the erythroagglutinating activity. The raw preparations and the fractions were electrophoretically evaluated and bands very similar to that of the PHA used as a pattern were obtained.

Subject headings: PHYTOHEMAGGLUTININS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zenteno E, Ortega M, Qin Z, Montrevil J, Debray H. Fast purification of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *Prep Biochem* 1994;24:175-83.
2. Vilarubia LO, Dubed M, de la Fuente JL, Menéndez JC, Noa E, Navea LM. Estudio de las propiedades biológicas de lectinas obtenidas de extractos vegetales de especies cubanas. *Rev Protección Veg* 1996;11:85-90.
3. Tanda N, Mori S, Nose M, Satio T, Song ST, Sato A, Teshima T. Expression of *Phaseolus vulgaris* leukoagglutinin-binding oligosaccharides in oral squamous cell carcinoma: possible association with the metastatic potential. *Pathol Int* 1999;46:639-45.
4. Hamelryck TW, Dao TM, Poortmans F, Chispeels MJ, Wyns L, Loris R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem* 1996;271:20479-85.
5. Goncalves RB, Costa CP. Isolation of de lectin and L4 isolectin from *Phaseolus vulgaris* by affinity chromatography on insoluble ovomucoid. *Braz J Med Biol Res* 1995;28:191-4.
6. Rigas DA, Osgood EE. Purification and properties of Phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* 1955;212:607-15.
7. Macart M, Gerbaut L. Evaluation of an improved coomassie dye binding method for urinary protein assay. *Clin Chem Acta* 1984;141:77-84.
8. Gorbunoff M. Protein cromatography on hydroxylapatite columns. En: Gorbunoff M. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc, 1991:330-9.
9. Lenier IE, Sharon N, Goldstein I. *Lectins: Properties function and application in Biology and Medicine*. London: Academic Press, 1986:1-40.
10. Leavitt RD, Felsted RL, Bachur NK. Biological properties of *Phaseolus vulgaris* isolectin. *J Biol Chem* 1977;252:2961-66.
11. Felsted RL, Leavitt RD, Chen C, Bachur NR, Dale RM. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochim Biophys Acta* 1981;668:132-40.

Recibido: 3 de diciembre de 1998. Aprobado: 15 de marzo de 1999.

Lic. *Patricia Hernández Díaz*. Laboratorios BETERA. Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.