



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

AREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Lupinus mutabilis* Sweet (TARWI) EN LA HEMAGLUTINACIÓN DE LOS ERITROCITOS HUMANOS DEL SERVICIO DE BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL NACIONAL CARLOS ALBERTO SEGUIN ESCOBEDO, AREQUIPA. 2016.

Katherine Teresa Maldonado Nina

Arequipa – Perú

2016



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

AREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Lupinus mutabilis* Sweet (TARWI) EN LA HEMAGLUTINACIÓN DE LOS ERITROCITOS HUMANOS DEL SERVICIO DE BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL NACIONAL CARLOS ALBERTO SEGUIN ESCOBEDO, AREQUIPA. 2016.

Bachiller: Katherine Teresa Maldonado Nina

Tesis presentada a la Universidad Alas Peruanas como requisito para la obtención del Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Director Asesor de tesis : Lic. TM Christian Felipe Rodríguez Zamora

Asesor Metodológico : Dr. Cesar Paz Bueno

Asesor de Redacción : Dra. Zoraida Salinas del Carpio

Arequipa – Perú

2016



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA
AREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

TEMA

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Lupinus mutabilis* Sweet (TARWI) EN LA HEMAGLUTINACIÓN DE LOS ERITROCITOS HUMANOS DEL SERVICIO DE BANCO DE SANGRE DEL HOSPITAL NACIONAL CARLOS ALBERTO SEGUIN ESCOBEDO, AREQUIPA. 2016.

Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de
Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y
Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas.

Mg. Juan José Velásquez Alvarado	Presidente	_____
Lic. Henry Adolfo Campos Pajuelo	Miembro	_____
Lic. Jack Michell Marchena Oliva	Secretario	_____

Arequipa – Perú

2016

Dedico el presente trabajo a:

A mi madre por su apoyo incondicional en todo este camino, y a toda mi familia por estar presente en todo momento.

Se agradece a:

Biólogo Forense Juan Edson Santos Lovaton por impulsarme a hacer algo diferente, sin él este trabajo nunca se hubiera concretado.

A toda mi familia, en especial a mi mamá y mi mamá Tere, por siempre alentarme a seguir adelante.

A la paciencia y buen humor de Obeth y de mis amigos que me dieron ideas y me facilitaron muchos trámites de documentos.

A todos mis maestros, ya que cada enseñanza suya se ha plasmado en este trabajo.

A todo el personal del servicio de Laboratorio Clínico, Anatomía Patológica y Banco de Sangre del HNCASE por su aprecio, amistad y todas las facilidades que me ofrecieron para realizar mi trabajo.

Dios los bendiga

Katherine Teresa Maldonado Nina

Resumen

La presente investigación se realiza en base a estudios anteriores sobre actividades hemaglutinantes de lectinas extraídas de legumbres. El extracto de semillas maduras de *Lupinus mutabilis* Sweet, que se obtuvo a partir de una extracción salina, presentó su efecto aglutinante en una suspensión fresca de hematíes humanos del subgrupo B (Clasificación ABO), lavados y suspendidos al 5% en su máxima concentración y a una temperatura de 4°C.

Los extractos de *Lupinus mutabilis* Sweet se obtuvieron a partir de semillas que fueron molidas a polvo fino, tamizadas y preparadas de acuerdo con las recomendaciones de la American Association of Blood Banks (AABB), determinándose además el grado de madurez de las semillas, la temperatura y la concentración adecuadas. Preparación de las muestras extraídas de 176 bolsas de Donantes sanos (Eritrocitos humanos normales), previamente lavados tres veces en Solución Salina y llevados al 5%, fueron incubados con las distintas soluciones de lectinas a temperatura ambiente y de refrigeración (4°C) durante el ensayo de hemaglutinación se registro que de los 176 donantes; 140 son "O", 23 "A", 12 "B" y uno "AB".

Determinándose a su vez que al minuto los hematíes pierden la capacidad de aglutinarse con el extracto crudo de las semillas maduras de Tarwi a su máxima concentración a 4°C.

Abstract

This research was done based on previous studies of hemagglutination activities lectin extracted from legumes. The extract of ripe seeds of *Lupinus mutabilis* Sweet, which was obtained from a saline extraction, introduced its binder effect in a fresh suspension of human erythrocytes subgroup B (ABO classification), washed and suspended at 5% in maximum concentration and 4 °C.

The extracts of *Lupinus mutabilis* Sweet were obtained from seeds were ground to fine powder, sifted and prepared in accordance with the recommendations of the American Association of Blood Banks (AABB), also determining the degree of maturity of the seeds, the temperature and appropriate concentration. Preparation of the samples from 176 bags from healthy donors (normal human erythrocytes), previously washed three times in Saline and brought to 5%, were incubated with various solutions of lectins at room temperature and cooling (4 ° C) during the test hemagglutination was record of 176 donors; 140 are " O ", 23 " A ", 12 " B " and one of them " AB ". Determined to turn at minute red cells lose the ability to coalesce with the crude extract of mature seeds Tarwi to its maximum concentration at 4 ° C.

LISTA DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	2
FICHA CATALOGRÁFICA.....	3
HOJA DE AROBACIÒN.....	4
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Problema de Investigación.....	11
1.2. Objetivos.....	13
1.3. Variables.....	14
1.4. Antecedentes Investigativos.....	16
1.5. Base Teórica.....	19
1.6. Conceptos Básicos.....	47
1.7. Hipótesis.....	49

CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Nivel, Tipo y Diseño de Estudio.....	51
2.2. Población.....	51
2.3. Técnicas e Instrumentos.....	52
2.4. Técnicas y Procesamiento de Análisis de Datos.....	57

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1. Resultados por Indicador de la variable 1: EXTRACTO DE L. MUTABILIS SWEET.....	62
3.2. Resultados por Indicador de la variable 2: HEMAGLUTINACIÓN.....	64
3.3. Resultados del Problema de Investigación.....:	65
3.4. Discusión de los resultados.....	67
CONCLUSIONES.....	69
RECOMENDACIONES Y/O SUGERENCIAS.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS.....	75
8.1. Anexo 1: Mapa y Ubicación.....	75
8.2. Anexo 2: Instrumento.....	76
8.3. Anexo 3: Protocolo o Manual de instrumento.....	78

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Problema de la Investigación

1.1.1. Descripción de la Realidad Problemática

El lupino, como lo es el Tarwi, es una legumbre comúnmente usada en la alimentación humana y animal, compuesto de proteínas, minerales y fibra dietética. Sin embargo su valor nutritivo puede verse afectado por diversos factores anti nutricionales tales como las lectinas. El gran potencial de las lectinas ha despertado un interés científico para fines de diagnóstico clínico y la demostración que es una herramienta útil para la investigación de hidratos de carbono en las superficies celulares, siendo la más estudiada la hemaglutinación.

Las lectinas poseen dos propiedades importantes, una acción mitogénica y una acción hemaglutinante, esta especificidad permitiría usar a las lectinas como reactivo de determinación de grupos sanguíneos y en la identificación de individuos secretores en centros de salud rurales donde el acceso a los reactivos para la determinación de grupos sanguíneos suele ser difícil, siendo un procedimiento sencillo y de bajo costo.

1.1.2. Formulación del Problema

1.1.2.1. Problema Principal

¿Cuál es el efecto del extracto de *Lupinus mutabilis* Sweet en la hemaglutinación de los eritrocitos humanos del servicio de

Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguín Escobedo, Arequipa. 2016?.

1.1.2.2. Problemas Secundarios

- a) ¿Cómo es el extracto de *Lupinus mutabilis* Sweet en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguín Escobedo, Arequipa. 2016?
- b) ¿Cómo es la hemaglutinación de los eritrocitos humanos en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguín Escobedo, Arequipa. 2016?

1.1.3. Horizonte de la Investigación

- A. Campo :Salud
- B. Área :Tecnología Médica - Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica
- C. Línea :Inmunohematología y Banco de Sangre

1.1.4. Justificación

La actividad hemaglutinante de las lectinas son una gran promesa, los extractos salinos de semillas reaccionan con carbohidratos específicos de las membranas celulares, lo que los convierte en reactivos de tipificación útiles y muy específico en las diluciones apropiadas. El extracto diluido de *Dolichos biflorus* aglutina los glóbulos rojos A₁ pero no los A₂. El extracto *Ulex Europeus* reacciona contra el determinante H. Existen otras lectinas valiosas como las de *Arachishypogaea* (anti-T), *Glycine max* (anti-t y anti-Tn), *Vicia gramínea* (anti-N) y *Salvia sclarea* (anti-Tn) para investigar la poliaglutinación de glóbulos rojos. Es decir, hay mucho campo para investigar otros extractos salinos de

semillas que puedan aglutinar hematíes y nos ayuden a una tipificación más específica. En el presente trabajo se busca determinar este fenómeno usando un extracto salino de semillas de *Lupinus mutabilis* (Tarwi), debido al gran porcentaje de proteínas que contiene y calcular el óptimo mecanismo de estas según diversos factores que favorecen a su actividad como la temperatura.

Siendo la extracción salina un método factible y de bajo costo si se tiene un laboratorio con el instrumental básico, se pueden descubrir más reactivos que ayuden a tipificar diversos sistemas sanguíneos en centros de salud donde reactivos de determinación suele ser un bien escaso y así, contribuir con estas líneas de investigación y dejar una base para estudios posteriores.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Determinar el efecto del extracto de *Lupinus mutabilis* (Sweet) en la hemaglutinación de eritrocitos humanos del Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo, Arequipa. 2016.

1.1.2. Objetivos Específicos

- a. Analizar el extracto de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo, Arequipa. 2016.

- b. Analizar la hemaglutinación en los eritrocitos humanos en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguí Escobedo, Arequipa. 2016.

1.2. Variables

1.2.1. Identificación de Variables

a. Variable Independiente: Extracto de *Lupinus mutabilis Sweet*.

El lupino andino (*Lupinus mutabilis Sweet*) es una planta leguminosa. Se caracteriza por tener elevado contenido de proteína y ácidos grasos. A su vez, siendo una leguminosa posee lectinas, que son glicoproteínas caracterizadas por ser capaces de unirse a carbohidratos específicos. Si estos carbohidratos se encuentran en la membrana del eritrocito, las lectinas pueden provocar su hemaglutinación, por lo que reciben el nombre de hemaglutininas.

b. Variable Dependiente: Hemaglutinación

Es la aglutinación de los hematíes o glóbulos rojos. Se debe a la presencia de antígenos en los eritrocitos capaces de reaccionar con anticuerpos o bien con proteínas específicas de algunos microorganismos (entre las que destacan las hemaglutininas).

1.2.2. Operacionalización de Variables

Variables	Dimensiones	Indicadores	Subindicadores	Instrumentos
1. Extracto de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	1.1.Extracción salina	1.1.1. Concentración	1.1.1.1. 10%	Ficha Observacional de Campo
			1.1.1.2. 40%	
			1.1.1.3. 100%	
	1.2. Condición del ensayo	1.2.1. Temperatura	1.2.1.1. 4°C	Ficha Observacional de Campo
			1.2.1.2. 25° C	
2.Hemaglutinación	2.1. Aglutinación directa en tubo	2.1.1 Fenotipo ABO'	2.1.1.1. Fenotipo "A"	Ficha Observacional de Campo
			2.1.1.2. Fenotipo "B"	
			2.1.1.3. Fenotipo "O"	
			2.1.1.4. Fenotipo "AB"	

Antecedentes Investigativos

1.2.3. A Nivel Internacional

A. ROJAS R. NARDA, ASCARRUNZ G. EUGENIA.

Producción de fitohemaglutinina a partir de dos variedades de poroto rojo (*Phaseolus vulgaris*) y control de su actividad mitogénica y genotóxica. La Paz, Bolivia. 2001.

Resultados: a) El análisis de varianza de la fitohemaglutinina de las tres variedades de poroto rojo (*Carioca mairana*) mostró diferencias altamente significativas en relación al tipo de variedad y a la dosis utilizada, es decir, que hubo un comportamiento diferente en cada planta y entre dosis. b) Las pruebas de Índice Mitótico y Proliferación Celular demostraron que la fitohemaglutinina obtenida fue de similar calidad que la fitohemaglutinina comercial. **Conclusiones:** 1) La producción de Fitohemaglutinina fue realizada en pequeña escala a partir de tres variedades de poroto rojo (Carioca, Carioca Mairana), sin embargo estas dos variedades tuvieron un comportamiento diferente en relación a las pruebas utilizadas para medir su actividad como producto mitogénico. 2) Por lo tanto la Fitohemaglutinina producida de la variedad *Carioca* y *Carioca Mairanase* comportaron de forma similar a la fitohemaglutinina control.

B. FALCÓN, A.; BEECKMANS, SONJA; VAN DRIESSCHE, E.
Investigación en la actividad hemaglutinante en tres especies de lupino. La Habana, Cuba. 2000. **Resultados:**
a) El extracto con la concentración de 20%, 40%, 60%, y 80% en las tres especies de *L. mutabilis*, estudiadas permitió una total actividad hemaglutinante, recíprocos a la concentración de la proteína diluida. b) A partir de nuestros resultados, es evidente que la actividad de hemaglutinina contra eritrocitos de conejo estaba presente en las tres especies probadas y, en todos los casos, fue necesario añadir sulfato de amonio hasta la saturación del 80%, con el fin de precipitar todas las hemaglutininas. c) De acuerdo a la determinación de enlaces de carbohidratos se pudo inhibir la hemaglutinación por haptenos, teniendo la *L. angustifolius* la mayor especificidad a la galactosa. **Conclusiones:** 1) Los resultados están de acuerdo con trabajos previos que demuestran la alta especificidad de las hemaglutininas de *L.albus* y *L.angustifolius* para la galactosa. 2) Estos resultados nos permiten prepararnos columnas adecuadas para la purificación y caracterización de hemaglutininas presentes en las especies de altramuz.

C. LUQUE T. ERNESTO. Comparación entre las lectinas extraídas de la semilla y la raíz de *Pisum sativum*. Nariño, Colombia. 1997. **Resultados:** a) La lectina presente en la raíz no se solubiliza en cloruro de sodio al 1%, los mejores resultados se obtuvieron con citrato 0,1 M. b) Llevar al extracto de raíz a un pH neutro provoca la pérdida de la actividad eritroaglutinante. **Conclusiones:** 1) Se demostraron diferentes comportamientos de ambas lectinas en las pruebas realizadas, lo que sugiere que se tratan de lectinas diferentes.

D. M. V. RODRIGUEZ. Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos humanos mediante el análisis de imágenes. Santa Fe, Argentina. 2014. **Resultados:** a) Se midió el perímetro (P) y el área (A) de los distintos aglutinados obtenidos, donde la *Glycine max* y *Medicago sativa* demostraron una aglutinación visible y sensible a células A. **Conclusiones:** 1) 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 el laboratorio.

1.2.4. A Nivel Nacional

DE AMAT HERBOZO C. Determinación de la actividad mitogénica in vitro del extracto de lectinas de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (tarwi) sobre poblaciones de linfocitos humanos de sangre periférica. Lima, Perú. 2015. **Resultados:** a) El extracto de lectinas del ecotipo Patón Grande mostró mayor actividad hemaglutinante sobre glóbulos rojos de conejo comparado con los de carnero y humano. b) Se evidenció proliferación y activación en los cultivos de células mononucleares, obteniéndose un aumento en la expresión del receptor para IL-2 en linfocitos T (CD25+), alcanzando un $43.7 \pm 1.4\%$ ($p < 0.01$) a $1 \mu\text{g/mL}$ de extracto. c) El porcentaje de linfocitos CD3+ fue superior respecto al control sin lectinas ($p = 0.02$); mientras que las subpoblaciones CD4+ y CD8+ mantuvieron las mismas proporciones que el control, indicando que no existe estimulación preferencial entre ambas. **Conclusiones:** a) Las lectinas del ecotipo Patón Grande tienen actividad mitogénica sobre linfocitos T y estimulan indistintamente a linfocitos T CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+.

1.3. Base Teórica

I. LUPINUS MUTABILIS SWEET (TARWI)

A. TRATAMIENTO SISTEMÁTICO

UBICACIÓN TAXONÓMICA (1)

Reino:Plantae

División:Magnophyta

Clase:Magnoliopsida

Orden:Fabales

Familia:Fabaceae

Subfamilia: Faboideae

Tribu:Genisteae

Género:Lupinus

Especie:*L.mutabilis*

Variedad: *Sweet*

B. DENOMINACIONES CULTURALES (1)

Nombre común: Aymara: tauri (Bolivia); Quechua: tarwi, tarhui (Bolivia, Perú), chuchus muti (Bolivia), chocho, chochito (Ecuador y Norte del Perú), chuchus (Bolivia), ccequilla (Azángaro Perú); Castellano: altramuz, lupino, chocho; Inglés: Andean lupine, pearl lupin.

C. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El tarwi, *Lupinus mutabilis Sweet*, es una leguminosa que fija nitrógeno atmosférico en cantidades apreciables de 100 kg/ha, restituyendo la fertilidad del suelo cultivada en el área andina desde épocas preincaicas. Se desarrolla en valles

templados y áreas alto-andinas. Su cultivo y consumo del grano paulatinamente están siendo disminuidos en los países andinos, sobretodo en Colombia, Argentina y Chile, no solo por falta de difusión de las formas de uso, sino también por el desinterés de las instituciones encargadas de promover su consumo y cultivo, a pesar de su gran valor nutritivo y resistencia a factores adversos climáticos en las zonas donde se siembra. Su cultivo se mantiene desde Ecuador, Perú, Bolivia hasta Chile y el noreste argentino, bajo distintos sistemas de producción. Los pobladores pre-incas domesticaron a esta planta, lo cual fue plasmado en cerámicas y tejidos. Sin embargo, fue desplazada por la introducción de cultivos europeos y a causa de esta marginación, el Tarwi ha sido una de las especies más afectadas debido a su fuerte sabor amargo por su contenido de alcaloides en el grano. Por lo que requiere de un proceso de lavado que elimine esos alcaloides. (1).

El Tarwi posee un alto contenido de nutrientes donde se destaca la proporción de proteína y grasas. Los valores de proteína y grasa son de 59% y 10.58%, respectivamente. Aunque otras especies también presentan valores similares, para el caso del *L. mutabilis* el valor máximo de proteína es de 49.22% en cotiledones. El valor proteico de la semilla entera y los cotiledones es superior al de otras materias primas comúnmente utilizadas en la industria alimentaria, como la

soya que tiene valores aproximados de 40%. Desde el punto de vista nutritivo estos resultados confirman que lupino es una leguminosa de alto potencial energético. Por otra parte, se encontró que las semillas de lupino contienen 7.35% de nitrógeno total, 55.95% de carbono y 9.83% de hidrógeno. Con base en el contenido de cenizas (5.52%) se estima que el contenido de oxígeno equivale a 21.35%. (2).

D. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El Tarwi es una planta anual que crece desde los 1500 m.s.n.m., se desarrolla en valles templados y áreas alto andinas; y es muy resistente al ataque de insectos. Es una leguminosa herbácea erecta. Presenta una raíz pivotante profunda que puede extenderse hasta los 3 metros de profundidad. Su tallo es robusto y leñoso, alcanzando una altura de 0,5 a 2m. Sus hojas están compuestas generalmente por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. La inflorescencia presenta una corola grande de 1 a 2cm, con cinco pétalos. El color de sus flores varía desde azul a morado. Las semillas están incluidas en una vaina y varían de forma (redonda, ovalada a casi cuadrangular), miden de 0,5 a 1,5cm. Los colores del grano incluyen blanco, amarillo, gris, ocre, pardo, castaño, marrón. (3).

E. LEGUMBRES Y LECTINAS

Las lectinas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, abarcando principalmente las familias Leguminosae, Graminaeae, Algae, Palmae. La mayoría de las lectinas vegetales se agrupan en cuatro grandes familias; Lectinas de leguminosas, lectinas que unen quitina, lectinas toxinas que inactivan al ribosoma (RIP) y lectinas monocotiledóneas específicas de manosa.

La familia de las leguminosas es la que tiene un mayor número de lectinas aisladas, desatándose principalmente las semillas, como el "trigo", "frejol", "soya", etc. También han sido aisladas de hojas, frutos, raíces y vasos, en las leguminosas pueden llegar a constituir del 23 al 28% de las proteínas totales de las semillas. De las muchas lectinas vegetales que han sido caracterizadas, la mayor parte correspondiente a lectinas secretoras, se sabe que ellas ingresan al sistema secretor para acumularse posteriormente en vacuolas, pared celular y espacios intercelulares. (4).

La Concanavalina A, que es una proteína que se obtiene de la planta *Cannavalia enzyformis*, actúa específicamente uniéndose a restos de a D-glucosa y a D-manosa. Otra lectina vegetal importante es la que se encuentra en el frijol rojo, *Phaseolus vulgaris* se sabe que tiene acción mitogénica, es decir, que tiene la capacidad de aglutinar específicamente células malignas, lo cual ha

desarrollado un gran interés en investigación para utilizarlas como tratamiento para el control de crecimiento de tumores. (5).

F. CONCEPTO DE LECTINA (6)

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas naturales de origen no inmune, presentes tanto en animales como en vegetales, bacterias o virus, que se caracterizan por poder unirse a carbohidratos específicos o libres. Si estos carbohidratos se encuentran en la membrana de célula pueden causar su aglutinación (por lo que reciben el nombre de hemaglutininas y fitohemaglutininas en caso de ser lectinas vegetales) y son capaces de un reconocimiento específico para un determinado carbohidrato uniéndose reversiblemente, sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos.

Hasta el momento no se sabe exactamente cuál puede ser su función biológica. Es posible que sea muy diversa, desde el reconocimiento del propio polen a la defensa frente a insectos.

Independientemente de esto, las lectinas son herramientas muy utilizadas en bioquímica, para el estudio de glicoproteínas, así como en biología celular y en investigación médica.

G. ESTRUCTURA DE LAS LECTINAS

Las lectinas están compuestas por una cadena polipeptídica en la cual pueden estar unidos uno o más residuos de carbohidratos, normalmente de 2 a 15 monosacáridos residuales, que pueden estar constituidos principalmente por dos o más azúcares como: D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido salicílico, glucosamina y galactosamina. (7).

El término lectina se aplica a proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica carbohidratos de la superficie celular o en suspensión, aglutinan células y precipitan glicoconjugados; las lectinas poseen por los menos dos sitios de reconocimiento a carbohidrato, de ahí su capacidad para aglutinar células.(9).

Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas, así como en vertebrados superiores. Aunque varias de estas proteínas poseen especificidad por estructuras sacarídicas semejantes, presentan actividades biológicas diversas, como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies, la estimulación mitogénica de linfocitos e inhibición de la fagocitosis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas

lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacárido. (8).

H. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS LECTINAS (10)

La fitohemaglutinina (PHA) o lectina aglutina tanto hematíes como leucocitos, se une a determinados oligosacáridos y estimula la mitosis en diferentes estirpes celulares, dentro de ellas los linfocitos. Estas lectinas están más abundantes en semillas, donde alcanza entre el 5 y el 10% del contenido proteico total y comprende cinco glicoproteínas tetraméricas (isolectinas) (PM=115000±4130 D, por ultracentrifugación), muy estables sobre todo en medio ácido y formadas por dos polipéptidos (L=leucocito y E=hematíe) en las combinaciones (L4, L3E1, L2E2, L1E3, E4). Las subunidades E (PM=31700±600 D) son responsables de la eritroaglutinación, pero muestran poca o ninguna actividad mitogénica, mientras que las subunidades L (PM=29900±200 D) confieren propiedades leucoaglutinantes a la proteína nativa y tienen la máxima actividad estimulante de la mitosis.

Las dos subunidades difieren en la secuencia de aminoácidos desde el residuo 1 al 7, pero son idénticas en las posiciones 8 a la 24. Los residuos 12 y 60 de cada subunidad son una asparagina glicosilada. Los últimos tres residuos de las subunidades son también semejantes.

Las isolectinas tienen una composición aminoacídica muy semejante; sólo difieren en los aminoácidos treonina, lisina y arginina y carecen de aminoácidos azufrados. Los oligosacáridos presentes en la proteína tienen un alto contenido de manosa (4 %) N-acetil-D-glucosamina (2,2 %) (Digestión con α -manosidasa y endo- β -N-acetilglucosaminidasa H). Aparecen también otros carbohidratos como fucosa y xilosa.

I. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS LECTINAS (11)

En los vegetales, la mayor parte de las lectinas se encuentran en órganos de reserva, lo cual da una evidencia indirecta de su papel como proteínas de defensa. Aun después del descubrimiento de las lectinas, los científicos han estado intrigados por sus posibles papeles biológicos. La función que realice dependerá del microorganismo u organismo en el que se encuentren. En caso de bacterias y hongos, es de determinar la patogenicidad de bacterias y parásitos, reconocimiento de determinantes no inmunes de la fagocitosis y el de determinantes de la adhesión celular. Las plantas la usan como unión de bacterias fijadoras de nitrógeno y una protección contra fitopatógenos.

Mientras que los animales usan las lectinas como reguladores de la migración y adhesión celular. Reconocimientos de la adhesión no inmune en la fagocitosis y unión a otros tipos de células.

J. LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN EN LAS PLANTAS (12)

La PHA se acumula, sobre todo, en las vacuolas de almacenamiento del parénquima de los cotiledones de las semillas, pero también se concentra en las raíces de la planta, específicamente en las vacuolas de los meristemas de las raíces primarias y en las paredes celulares de las raíces elongadas. Mediante PCR reverso-transcriptasa se ha demostrado la existencia casi exclusiva de ARNm de la isoforma PHA-E en estos últimos sitios. Se presume que la PHA junto con la arcelina y el inhibidor del alfa-amilasa participa en mecanismos de defensa en la planta. Estas últimas dos proteínas son consideradas formas truncadas de la PHA en las cuales se han perdido, una y dos de las vueltas o lazos necesarios para unirse a carbohidratos, respectivamente, aboliendo de ellas esta propiedad. La PHA actúa protegiendo las semillas contra virus, bacterias, hongos y herbívoros invertebrados, papel determinado en gran medida, por la capacidad de reconocer y unirse a glicanos extraños a la planta.

K. BASES ESTRUCTURALES DEL RECONOCIMIENTO E INTERACCIÓN CON LOS CARBOHIDRATOS

La gran mayoría de las propiedades biológicas de las lectinas estudiadas hasta el momento se basan en la capacidad para reconocer e interactuar con diferentes carbohidratos. La

especificidad para estas moléculas varía ampliamente entre las diferentes lectinas, condicionado por la variabilidad estructural de los sitios de unión, donde las interacciones hidrofóbicas, las modificaciones postraduccionales y la oligomerización juegan un papel esencial. Los análisis extensivos de las secuencias y estructuras de varias lectinas muestran que a pesar de la hipervariabilidad de sus regiones de combinación, ellas exhiben un significativo patrón de uniformidad, y la especificidad por los diferentes monosacáridos parece depender de un núcleo conservado de residuos que forma puentes de hidrógeno con el azúcar y una vuelta o lazo variable que determina la forma exacta del sitio de unión. La alta afinidad por oligosacáridos y monosacáridos particulares que contienen sustituyentes hidrofóbicos resulta fundamentalmente de la existencia de distintos sub-sitios próximos al sitio de unión a los carbohidratos; sub-sitios que tienen un pequeño número de residuos y se encuentran tanto en sitios específicos para manosa como para galactosa. (9).

Las unidades estructurales de los carbohidratos, monosacáridos o azúcares sencillos pueden engarzarse entre sí en varios puntos y de varias formas, si tenemos en cuenta la isomería α/β . Los aminoácidos de las proteínas y los nucleótidos de los ácidos nucleicos se limitan, en cambio, a generar estructuras lineales, lo que restringe su diversidad. Merced a tamaña capacidad de crear un repertorio amplio de

isómeros a partir de unos pocos azúcares sencillos, los polisacáridos constituyen las moléculas de reconocimiento por excelencia. (13)

El potencial informativo codificado en la estructura de los polisacáridos (lo que ha dado en llamarse glicocódigos) se descifra en la unión selectiva de lectinas a glicanos. Los polisacáridos gozan de una amplia distribución en sistemas unicelulares y organismos pluricelulares. Se encuentran de forma libre o unidos (por un enlace covalente) a proteínas o lípidos en la membrana celular, a proteínas de la matriz extracelular, a proteínas de los fluidos biológicos y otras. (13)

Las lectinas son el medio de fijación de diferentes tipos de células, bacterias, virus o toxinas. En algunos casos las lectinas de superficie de las células se unen a carbohidratos acoplados a proteínas (glicoproteínas) o lípidos (glicolípidos), funcionando como sitios de unión a lectinas. Las interacciones de estas lectinas con células pueden ser inhibidas en muchos casos por carbohidratos, lo que ha proporcionado útiles marcadores celulares que son empleados en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática. (9)

Los microorganismos van a utilizar este mecanismo para realizar los procesos de infección. El primer reporte, realizado en la década de los 50, fue con el virus de la influenza, donde

demonstraron que los virus reconocen carbohidratos específicos en las células hospederas. Este mismo mecanismo es empleado por bacterias, hongos y protozoarios. En plantas, las lectinas participan en la protección contra insectos y microorganismos dañinos, controlan la germinación, transporte y almacenamiento de azúcares y en la simbiosis. El primer reporte de su papel protector se obtuvo cuando se alimentaron escarabajos con una dieta rica en lectinas de frijol negro, lo que resultó en la muerte de las larvas. En cuanto a la protección contra microorganismos patógenos se basó en las observaciones de Barkai- Golan en las cuales lectinas inhibían la esporulación y el crecimiento de hongos como *Trichoderma viride*, *Penicillium notatum* y *Aspergillus niger*, posteriormente se descubrieron los mismos resultados para otros hongos. (9)

En animales las lectinas realizan una gran diversidad de funciones, relacionadas con el reconocimiento celular como son: fertilización, regulación del tejido conectivo, apoptosis (muerte celular programada), en respuestas inflamatorias (en infecciones locales), en el sistema inmune y en la determinación y diferenciación tisular en diversas fases embrionarias.(9)

Dentro de las lectinas hepáticas, el receptor sialoglicoprotéico, reconoce residuos terminales de galactosa en glicoproteínas séricas, determinando así, la vida media de proteínas glicosiladas. El receptor para manosa fosfato, se encuentra

involucrado crucialmente en el tráfico intracelular de enzimas lisosomales. (13)

En los procesos de defensa no inmune o inmunidad nata, participan diferentes lectinas, que en ausencia de opsoninas (anticuerpos y complementos) se unen a carbohidratos presentes en las superficies de los microorganismos patógenos, provocando su encapsulación y muerte, proceso llamado lectino-fagocitosis. Dentro de las lectinas identificadas están: El receptor específico para manosa, presente en macrófagos; La lectina-1 específica para hongos presentes en hongos; Las lectinas solubles que unen a manosa (MBLs, en el grupo de colectinas), que atacan a los microorganismos que presentan manosa en sus superficies como son hongos y microbios, pero no ataca a las unidades de oligo-manosa de glicoproteínas de mamíferos, debido a que tienen un arreglo estructural diferente. (13)

Actualmente se están enfocando esfuerzos por parte de investigaciones en ciencia básica y en la industria para aplicar carbohidratos para terapias anti-adhesión contra microorganismos patógenos. (22)

L. APLICACIONES DE LAS LECTINAS

Dadas las propiedades de aglutinar células sanguíneas, la PHA se utilizó inicialmente como medio para separar glóbulos rojos de la sangre total. Al demostrarse posteriormente el efecto mitogénico, el espectro de aplicaciones se incrementó y actualmente se usa como factor estimulante de la proliferación en cultivos de diferentes estirpes celulares, incluido los linfocitos, en los que también actúa sobre los procesos bioquímicos relacionados con la respuesta inmune. (14)

Otras aplicaciones incluyen el estudio in vitro de los mecanismos bioquímicos de la apoptosis y de la proliferación celular en linfocitos, su empleo como marcador histoquímica en estudios de neurofisiología, neuroanatomía y en el proceso de envejecimiento del SNC, como marcador farmacológico para el seguimiento de la respuesta al tratamiento y toxicidad de medicamentos y en la producción y mejora de medios diagnósticos y métodos analíticos. (15).

II. HEMAGLUTINACION

A. AGLUTINACIÓN (16)

En la reacción de aglutinación, los principios son los mismos que en la precipitación, la diferencia radica en que en este caso el antígeno no es soluble sino particulado (ejemplo: bacterias, células, glóbulos rojos etc.).

La formación de las redes dará como consecuencia agregados en forma de grumos en el fondo del tubo. El antígeno no se encuentra en solución sino en suspensión y al ser una partícula grande, se formen o no los agregados, sedimentará; la diferencia entre una reacción negativa, donde lo que vemos en el sedimento es sólo el antígeno y una positiva, donde se forman los complejos, está dada por la característica visual del sedimento que, en el primer caso será un botón homogéneo de células y en el segundo serán grumos. Cuando el anticuerpo está dirigido contra antígenos constitutivos de la partícula, se trata de una aglutinación directa, por ejemplo la determinación de grupos sanguíneos o la detección de antígenos bacteriano, mientras que la interacción del anticuerpo con un antígeno soluble cualquiera acoplado a una partícula inerte o a una célula, como por ejemplo un glóbulo rojo, se denomina aglutinación pasiva. Esta es más sensible que la directa debido a la posibilidad de regular la densidad de los determinantes sobre la superficie de la partícula.

La aglutinación puede ser:

- i. **Cualitativa:** Es la típica reacción de determinación de grupo sanguíneo, donde se ponen en contacto la sangre a determinar con sueros de distintos grupos, y se considera la producción.
- ii. **Cuantitativa:** No es muy usada, consiste en medir proteínas en el aglutinado.
- iii. **Semicuantitativa:** Esta técnica se realiza normalmente en micro tubos o placas de fondo en U y consiste, al igual que en el caso de la precipitación, en colocar concentraciones constantes de uno de los reactivos en contacto con concentraciones variables del reactivo a determinar. Así, obtenemos el título, que será, igual que en todo ensayo semicuantitativo, la inversa de la mayor dilución que da un resultado positivo.

B. REACCIONES DE AGLUTINACIÓN (17)

Las reacciones de aglutinación y de precipitación son la base de la mayor parte de las técnicas inmunológicas. Su principio se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Para comprender lo anterior es necesario definir qué es un antígeno y un anticuerpo. Antígeno es una sustancia de alto peso molecular, con cierta rigidez estructural y que tiene la particularidad de ser parcialmente “metabolizado” por células especializadas llamadas macrófagos, por lo tanto es capaz de generar una respuesta inmune en un organismo que la detecte como un agente extraño. Mientras que un anticuerpo es una

glicoproteína, producida por linfocitos B activados, llamados células plasmáticas, como respuesta a la presencia de un antígeno en el organismo, a su vez los anticuerpos pueden ser producidos por líneas celulares in vitro, como es el caso de la producción de anticuerpos monoclonales.

Según Coombs existen 3 requerimientos principales en las pruebas de aglutinación: 1. Disponibilidad de una suspensión estable de células o de partículas. 2. Presencia de uno o más antígenos cercanos a la superficie. 3. Conocimiento de que los anticuerpos "incompletos" o no aglutinables no son localizables sin modificación (reacciones anti globulina).

Existen diferentes tipos de clasificación de las reacciones de aglutinación:

- a) **Aglutinación directa:** Un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo. Un ejemplo de esto es la aglutinación de los eritrocitos del grupo A por antisueros anti-A, la aglutinación de los eritrocitos RH positivos por el antisuero anti-D o la aglutinación del antígeno brucelar por anticuerpos anti-Brucella. Gran cantidad de partículas como pueden ser eritrocitos, bacterias, hongos y virus pueden ser aglutinados por anticuerpos séricos, algunas veces de manera inespecífica y otras muy específicas, siendo ésta última, respuesta a una previa inmunización del organismo productor de los anticuerpos séricos. Las pruebas para identificar anticuerpos específicos son llevadas a cabo titulando seriadamente antisueros

en diluciones al doble en presencia de una cantidad constante de antígeno.

- b) **Aglutinación indirecta:** Se refiere a la aglutinación de las células recubiertas de antígeno o a las partículas inertes que son portadoras pasivas de antígenos solubles. Se tienen ejemplos de lo anterior en la utilización de partículas de gelatina en la búsqueda de anticuerpos contra *Treponema pallidum* por aglutinación pasiva (TPPA), la fijación del látex para VDRL en la sífilis y en la utilización de eritrocitos en la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI) en la búsqueda de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas. De manera alterna, el antígeno puede ser localizado recubriendo partículas de látex o eritrocitos con anticuerpo purificado y practicando la llamada aglutinación inversa.
- c) **Hemaglutinación viral:** Otra categoría de aglutinación que involucra la aglutinación espontánea de los eritrocitos por ciertos virus, es la reacción de hemaglutinación viral, la cual puede inhibirse de manera específica en presencia de anticuerpos. Por lo tanto, la hemaglutinación viral puede emplearse para medir la cantidad de virus o para determinar, por inhibición homóloga, el título de los anticuerpos dirigidos en contra de los virus hemaglutinantes.

C. ACCION SEROLOGICA DE LA AGLUTINACION DE ERITROCITOS

En las técnicas de grupos sanguíneos eritrocitarios las reacciones más importantes son las de aglutinación. Los antígenos situados en la membrana de los hematíes reaccionan con los anticuerpos y el resultado de la reacción es la formación de grumos de hematíes o aglutinados. Las determinaciones de antígenos hemáticos y el estudio de anticuerpos en sueros se basan principalmente en la aglutinación de los hematíes, aunque en ocasiones la unión antígeno/anticuerpo que activa la vía clásica del sistema del complemento puede ser detectada por una hemólisis «in vitro». Los anticuerpos de grupo sanguíneo esencialmente hemolíticos son: anti-A, anti-B, anti-Lea, anti-Vel y anti-PP1p. (16)

La reacción hemolítica «in vitro» debida a los anticuerpos de grupo sanguíneo se produce con poca frecuencia ya que la secuencia de la activación del complemento se interrumpe a partir del componente C3. Un factor muy importante es el tipo de inmunoglobulina a que pertenecen los anticuerpos reaccionantes. Si los anticuerpos son del tipo IgM la aglutinación se produce directamente. Por su tamaño molecular y la distribución de los lugares de reacción con los antígenos, pueden unirse fácilmente con varios hematíes y producir su aglutinación. (16)

La sensibilización de hematíes por anticuerpos de tipo IgG no puede producir aglutinación. La molécula de IgG es demasiado pequeña para unirse a más de un hematíe a no ser que se acople alguna partícula. La distancia que han de salvar los anticuerpos

para producir aglutinación es la que guardan entre sí los hematíes en suspensión en su propio suero o plasma o en un medio salino isotónico, distancia que viene impuesta por las fuerzas de repulsión existentes entre los hematíes. La teoría más ampliamente aceptada para explicar este hecho es la del potencial Zeta. La superficie de los hematíes tiene cargas eléctricas negativas debidas a los carboxilos del ácido siálico (NANA) de la membrana. Si los hematíes están en suspensión en un medio que contiene iones libres, los cationes forman una envoltura de cargas positivas alrededor de aquellos convirtiéndolos en partículas cargadas de electricidad del mismo signo que experimentan una fuerza de repulsión entre ellas. La base molecular de la unión de los antígenos con los anticuerpos la constituyen múltiples atracciones intermoleculares no covalentes, reversibles:

- Uniones hidrófobas con exclusión de moléculas de agua en las zonas de interacción.
- Puentes de hidrógeno (O-H-O, N-H-N, O-H-N).
- Fuerzas de Van der Waals, resultantes de la interacción entre nubes electrónicas y uniones hidrófobas. Son fuerzas débiles pero la suma de las mismas puede ser importante en las uniones antígeno/anticuerpo. Fuerzas electrostáticas procedentes de la atracción entre aminoácidos de cargas opuestas. (16)

La reacción serológica de aglutinación de los hematíes que constituye el punto final de técnicas en las que intervienen antígenos hemáticos y anticuerpos de grupo sanguíneo, está

influenciada por diversos, factores que deben tenerse en cuenta para obtener los mejores resultados en el laboratorio y que a continuación se exponen. (18)

D. ESTRUCTURA DEL SISTEMA ABO (19)

Como la naturaleza química de los antígenos del Sistema ABO son carbohidratos, se proponen que los alelos A y B codifican 2 glicos transferasas que son enzimas que permiten la transferencia de azúcar inmunodominante específico (N-acetilgalactosamina y D-galactosa) a la proteína precursora mediante un enlace glicosídico.

Los antígenos A y B fueron originalmente identificados en los glóbulos rojos. Sin embargo, más adelante también se encontraron en otros tipos de células y secreciones. Por ejemplo, las células endoteliales que forman las paredes de los capilares expresan estos antígenos, dependiendo del grupo sanguíneo. Por lo tanto, el sistema ABO de grupo sanguíneo es importante no sólo para transfusión de sangre, sino también para el trasplante de células, tejidos y órganos. Además, sangre, pelos y líquido seminal son elementos importantes como pruebas en la escena de un crimen.

La expresión de los antígenos A y B no es siempre constante sino que fluctúa durante el desarrollo, la

diferenciación e incluso durante la carcinogénesis de las células. El esclarecimiento de cómo se controla la expresión de estos antígenos es un problema importante tema de investigación. Es otra importante cuestión por resolver por qué están presentes de forma "natural" los anticuerpos contra los antígenos A y B en el plasma de individuos que no expresan esos antígenos. Los antígenos A y B no son antígenos proteicos, sino oligosacáridos con las estructuras químicas GalNAc α 1-3 (Fuc α 1-2) Gal- y Gal α 1-3 (Fuc α 1-2) Gal-, respectivamente. Los inmunoazúcares dominantes son GalNAc (N-acetil-D-galactosamina) y D-galactosa para los antígenos A y B, respectivamente. La diferencia entre estos dos azúcares es que la GalNAc tiene un -NHCOCH₃ en la posición C2, mientras que la galactosa tiene un -OH en esta posición.

E. METODOLOGIAS Y CLASIFICACIÓN DE LA REACCION

ANTIGENO – ANTICUERPO (20)

Existen muchos tipos de pruebas metodológicas, incluyendo la tecnología con gel, microplacas y ensayos en tubo, que son usadas para interpretar el sistema ABO/Rh y las pruebas de screening de anticuerpos.

Independientemente del método seleccionado, el fin es detectar interacciones de antígenos y anticuerpos. El signo visible de una interacción de antígenos y anticuerpos

depende de la metodología que se use. En las pruebas de gel, una clasificación de 0 representa un botón de células en la parte inferior o la punta de los micro tubo, una clasificación de 4+ representa un agregado de células en la parte superior de la superficie del gel, y 1+, 2+ y 3+ son las clasificaciones de reacción que se determinan por la dispersión de las células a lo largo de gel en el micro tubo.

Las microplacas emplean una tecnología de fase sólida donde los antígenos y anticuerpos reaccionan y se adhieren a la pared del pocillo, el cual es indicativo de una prueba positiva; la no adherencia o un botón de células en el centro del pocillo indica una prueba negativa. La fuerza de la reactividad está basada en la dispersión de las células a través de la placa, para ensayos en tubo, las reacciones de aglutinación están basadas en el tamaño del botón disgregado del fondo del tubo.

Aglutinación en Tubo: Las Aglutinaciones en Tubo proporcionan un menor número de reacciones falsas negativas/positivas comparado a una aglutinación en placa.

a) Tipificación del Sistema ABO

Determinar el grupo ABO de un paciente es la prueba más importante realizada en un Banco de Sangre o Servicio de Transfusión. El estudio de la clasificación ABO al receptor incluye un estudio al antígeno (directo) y al anticuerpo

(inversa). La técnica de tubo de ensayo es frecuentemente usada. La determinación directa se realiza colocando una gota de antisuero preparado comercialmente anti-A y anti-B en tubo rotulado y se agrega una gota de 4% a 6% de suspensión de glóbulos rojos del paciente en una solución salina. La mezcla se centrifuga, se resuspende suavemente y se observa agregados, lo que indica la presencia del antígeno A o B, o ambos, y si no aglutina indica la ausencia del antígeno A o B.

Las reacciones son observadas y registradas. La tipificación inversa se realiza mezclando el suero o plasma del paciente con glóbulos rojos A₁ o B. el plasma o suero y las células se centrifugan, resuspende, y se observa la hemólisis o aglutinación indicando la presencia de los antígenos anti-A o anti-B, o ambos.

III. COMPOSICIÓN Y FUNCION DEL ERITROCITO (21)

El eritrocito o hematíe es la célula sanguínea especializada en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono unidos a hemoglobina. Es de pequeño tamaño y tiene forma bicóncava. No tiene núcleo ni orgánulos.

A. ESTRUCTURA:

Los hematíes no son verdaderas células ya que no tienen núcleo y carecen de orgánulos envueltos en membrana. Los hematíes tienen las siguientes características: A) Se tiñen de color rosa salmón con la tinción de Giemsa: se ven más teñidos en la zona periférica (más gruesa) que en la central (más fina) por la diferente cantidad de hemoglobina que contienen B) Son corpúsculos bicóncavos (7'5 μm diámetro, 2 μm grosor máximo y 1 μm de grosor mínimo). C) Son muy flexibles y pueden deformarse transitoriamente para adaptarse a la pequeña luz de los capilares D) En condiciones normales pueden aparecer hematíes con alguna característica particular: equinocito o eritrocito crenado: tienen forma esférica con 20-30 espículas (parecido a un erizo de mar). Se producen estas formas cuando los hematíes tienen un bajo nivel de ATP que es en parte responsable del mantenimiento de la forma del hematíe, reticulocito o eritrocito policromatófilo: es un eritrocito joven en el que aún quedan ribonucleoproteínas en su interior. Estas proteínas se tiñen de azul y forman una red. Suponen el 0.8% de los eritrocitos.

B. ULTRAESTRUCTURA:

Hemoglobina: le confiere al hematíe un aspecto homogéneo, un poco granular, supone el 33% del contenido del hematíe (el 95% del peso seco del citoplasma).

Citoesqueleto: los hematíes tienen un citoesqueleto adosado a la cara interna de la membrana celular que mantiene su forma bicóncava, una forma que le proporciona una gran superficie en relación al volumen, un factor muy importante para cumplir con su función. Las proteínas que componen el citoesqueleto del hematíe son las siguientes: A) Espectrina: forma tetrámeros en forma de bastoncillos (200 nm longitud) y es el componente fundamental del citoesqueleto B) Actina: filamentos de 7 nm de longitud Los extremos de 5-6 tetrámeros de Espectrina se unen entre sí mediante los cortos filamentos de Actina y forman una especie de red deformable subyacente a la cara citoplasmática de la membrana del hematíe. Esta red de espectrina-actina se ancla a ciertas proteínas que forman parte de la membrana del hematíe (proteína banda 4.1, glicoforina, anquirina, proteína banda 3).

Función: A) Transportar O₂ desde el pulmón a los tejidos. B) Transportar CO₂ desde los tejidos al pulmón La energía que necesita el hematíe para mantener la hemoglobina reducida y para mantener el equilibrio iónico la obtiene de la glucólisis anaeróbica.

Forma y tamaño de los hematíes: Los hematíes normales, son discos bicóncavos con un diámetro medio de aproximadamente 7.8 micrómetros y un espesor en su punto más ancho de 2.5 micrómetros y en el centro de 1 micrómetro o menos. El volumen medio de los hematíes es de 90 a 95 micrómetros cúbicos. Las formas de los hematíes pueden cambiar mucho cuando atraviesan los capilares. Además, debido a que el hematíe normal tiene un gran exceso de membrana celular para la cantidad de material que tiene dentro, la deformación no estira la membrana demasiado y, en consecuencia, no rompe la célula, como sería el caso de otras células.

1.4. Conceptos Básicos

1. **Aglutinación:** Fenómeno en el que células o bacterias entran en suspensión en un líquido y precipitan cuando se añaden anticuerpos; éstos se unen a sus antígenos y originan complejos del tipo células-antígenos-anticuerpos en forma de grumos visibles a simple vista.
2. **Antígeno:** Todas las sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema inmune adaptativo, bien sean propias o ajenas.
3. **Dilución:** La reducción de la concentración de una sustancia química en una disolución.
4. **Ecotipo:** Es una subpoblación genéticamente diferenciada que está restringida a un hábitat específico, un ambiente particular

o un ecosistema definido, con unos límites de tolerancia a los factores ambientales.

5. **Especificidad:** Es la reactividad selectiva de un anticuerpo con su correspondiente antígeno, evitando que pueda reaccionar con otros.
6. **Fenotipo:** La expresión del genotipo en función de un determinado ambiente.
7. **Fitohemaglutinina:** Lectinas de origen vegetal.
8. **Glucoproteínas:** Las glicoproteínas o glucoproteínas son moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos, simples o compuestos. Destacan entre otras funciones la estructural y el reconocimiento celular cuando están presentes en la superficie de las membranas plasmáticas (glucocálix).
9. **Hemaglutinación:** La hemaglutinación es la aglutinación de los hematíes o glóbulos rojos. Se emplea rutinariamente en técnicas de tipado de grupos sanguíneos o en la determinación de cargas virales.
10. **Hemaglutinina:** La hemaglutinina es una sustancia (proteína) que causa la aglutinación de los hematíes o glóbulos rojos de la sangre. Este proceso recibe el nombre de hemaglutinación.
11. **Hemolisis:** O eritrocateresis, es el fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes).
12. **Lectinas:** Las lectinas son proteínas que se unen a azúcares con una elevada especificidad para cada tipo

distinto. Su principal papel está en los fenómenos de reconocimiento, tanto a nivel molecular como celular.

13. **Leguminosa:** Son una familia del orden de las fabales. Reúne árboles, arbustos y hierbas perennes o anuales, fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y sus hojas compuestas y estipuladas.
14. **Lupino:** Es un género botánico de leguminosas con alrededor de 200 especies originarias del Mediterráneo y América.
15. **Tipificar:** Representar en el tipo de la especie o clase a que pertenece.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis Principal

Si el *Lupinus mutabilis* Sweet posee diferentes moléculas, entre una de ellas las lectinas, que poseen la capacidad de unirse de forma específica a moléculas de azúcares, formando uniones muy similares a los anticuerpos con sus respectivos antígenos y debido a esta propiedad las lectinas pueden precipitar glicoconjugados y aglutinar células que posean carbohidratos específicos a esta en su superficie. Entonces el extracto de *Lupinus mutabilis* Sweet tendría un efecto positivo y una intensidad alta en la hemaglutinación en eritrocitos humanos en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo, Arequipa. 2016.

1.5.2. Hipótesis Secundarias

- a) El extracto de *L. mutabilis* Sweet estará mediada estrictamente según su concentración y temperatura adecuada en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguín Escobedo, Arequipa. 2016.
- b) La detección de la hemaglutinación de los eritrocitos humanos se determina según su intensidad en: negativo, 1+, 2+, 3+, 4+ y hemólisis, en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Seguín Escobedo, Arequipa. 2016.

CAPITULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Nivel, Tipo y Diseño de la Investigación (Según *Selltiz et al., 1965; Babbie, 1979*)

2.1.1. Nivel de la Investigación

Nivel Explicativo

2.1.2. Tipo de Investigación

Aplicada

2.1.3. Diseño de la Investigación

Transversal

2.2. Población y Muestra

2.2.1. Población

Se trabajó con la población total; 176 bolsas de sangre de donantes sanos.

2.2.1.1. **Criterios de Inclusión:** Eritrocitos con fenotipo A, B, AB y O. Eritrocitos obtenidos de bolsas de donantes sanos (negativos en las 7 pruebas de tamizaje). Eritrocitos obtenidos entre el periodo del 23 al 31 de Marzo del 2015.

2.2.1.2. **Criterios de Exclusión:** Eritrocitos de bolsas de donación dañadas, Hemolizadas o pasada su fecha de viabilidad. Obtenidos entre el periodo del 23 al 31 de Marzo del 2015.

2.3. Técnicas, Instrumento y Procedimiento

2.3.1. Técnicas

Técnica de la Observación de Campo

2.3.2. Instrumentos

Ficha de observación de Hemaglutinación

- a) Descripción de la Ficha de Observación de Hemaglutinación: Según Navarro y Pérez, la observación de la hemaglutinación con lectinas se ha calificado como un procedimiento rutinario de tipificación de glóbulos rojos para su selección en los sistemas ABO y otros de acuerdo a presencia o no de carbohidratos en su membrana. Siendo analizados en este trabajo según el sistema ABO y la concentración del extracto de la lectina de *Lupinus mutabilis* (10%, 40% y 100%) y la temperatura de estos mismos, con parámetros como: negativo, 1+, 2+, 3+, 4+, y hemólisis, estos están designados según el Banco de sangre y el método que se use que para este caso será de tipificación en tubo con uso de la centrifuga y la observación de la formación o ausencia del botón aglutinado, así mismo indicando la máxima dilución que pueda llegar el aglutinado si llegase a formarse.
- b) Validez y confiabilidad de la Ficha de Observación: La estandarización de este método para lectinas se ha dado por los estudios de Etlicher y colaboradores en su libro; *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology*

and Medicine, hecho en eritrocitos humanos y de animales siguiendo diferentes concentraciones. Además los trabajos presentados a lo largo de las investigaciones relacionadas a la hemaglutinación con lectinas han seguido el esquema de Navarro y Pérez con una determinación rutinaria de tipificación de glóbulos rojos. Falcón, Sonja Beeckmans y E. Van Driessche también se rigen del procedimiento de la AABB para identificar la aglutinación por lectinas como una tipificación de glóbulos rojos.

- c) Aplicación de la Ficha de Observación: Para calificar los ensayos de eritroaglutinación se siguió la metodología descrita por Navarro y Pérez usándose suspensiones de lectinas con eritrocitos humanos al 5% del tipo A+, B+ y O+. Los extractos salinos de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet en diferentes concentraciones por precipitación con Sulfato de Amonio (10%,40% y 100%). Se observó la presencia de aglutinación y su cualificación así como su ausencia o la presencia de hemólisis la cual se especificó en la ficha de observación junto con un control positivo y un control negativo.
- d) Modelo de la Ficha de Observación: Su modelo se adjunta en el Anexo Nro. 2.

2.3.3. Procedimiento

Extracción de lectinas del *Lupinus mutabilis Sweet*

1. Evaluación de la condición de semillas maduras variedad Sweet según Ávila (1979):

La clasificación de madurez de las semillas de Tarwi se estableció en tres ámbitos principalmente:

a) Color de las semillas:

- Blanco: Puede ser color entero o combinado.
- Bayo: Puede ser color entero o combinado.
- Pardo: Puede ser color entero o combinado.
- Negro: Puede ser color entero o combinado.
- Verde: Puede ser color entero o combinado.

De las cuales se consideran maduras todas aquellas que no presenten un color verde entero o combinado.

b) Peso:

- Grandes: Granos que en un número de 100 pesan más de 27g.
- Medianos: Granos que en un número de 100 pesan entre 20 y 27g.
- Pequeños: Granos que en un número de 100 pesan menos de 20g.

Se consideran maduros a las semillas medianas y grandes.

c) Tamaño: Las semillas del Tarwi var. Sweet están incluidas en número variable en una vaina de 5 a 12 cm y varían de forma

(redonda, ovalada a casi cuadrangular), las semillas maduran miden entre 0,8 a 1,5 cm.

2. Preparación de las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet*

- a. Moler las semillas en un procesador de alimentos hasta que las partículas tengan un aspecto de arena gruesa.

3. Extracción salina de lectinas de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet*

- a. Colocar 100 gramos de las semillas y agregar 400 ml Solución Salina al 0,9%.
- b. Llevar la muestra a un tubo cónico.
- c. Refrigerar a 4°C de 4 a 12 horas.
- d. Centrifugar en el tubo cónico a 1200RPM por 10 minutos.
- e. Separar el sobrenadante en otro tubo cónico.
- f. Filtrar el sobrenadante.
- g. Almacenar a 4°C o congelación en otro tubo cónico previamente rotulado.

4. Concentración por Saturación con Sulfato de Amonio

Las proteínas contenidas en el sobrenadante del extracto crudo se precipitaron con sulfato de amonio a 10, 40 y 100% de saturación a temperatura ambiente y la cantidad de sulfato de amonio requerido en cada caso se calculó de acuerdo a un calculador en la página web: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.html>.

1. Primero se preparó una solución saturada con 550 g de Sulfato de Amonio y 1 litro de Agua Destilada. Se calienta suavemente para poder disolverlo.

2. Se añadió 286.7 g para lograr una concentración al 100%, 93.35 g para el 40% y 21.35 g para 10%. Todo ello con un Volumen de 400mL y a 4°C de Temperatura.

3. Para poder sedimentar las proteínas se centrifugó a 20.000 RPM a 4°C. El sedimento se recuperó y se resuspendió en una 10mL de Solución Salina Fisiológica y se reposó 10 horas. Se centrifugó por última vez a 20.000 RPM y se resuspendió en Solución Salina Fisiológica para evitar cualquier lisis de las células.

5. Preparación de glóbulos rojos.

- a. Recoger 10 ml de sangre.
- b. Centrifugar a 3.500 rpm 5 min
- c. Retirar el plasma y todo lo posible de la capa leucocitaria.
- d. Lavar los glóbulos rojos 3 veces en Solución Salina.
- e. Suspender los glóbulos rojos al 5% en Solución Salina.
- f. Conservar a 4°C.

6. Ensayo de hemaglutinación

1. Colocar 100uL del concentrado del extracto de la lectina.
2. Agregar 1 gota de la suspensión al 5% (50uL) con el uso de la pipeta de los glóbulos rojos en estudio a cada tubo.
3. Mezclar el contenido de los tubos con suavidad y centrifugar a 3500 RPM por 15 segundos.
4. Resuspender con suavidad las células y examinar en búsqueda de alguna aglutinación.

Leer, interpretar y registrar los resultados.

2.4. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

2.4.1. Matriz de Base de Datos

23 de Marzo del 2016			
Número de Bolsa	Grupo Sanguíneo ABO	Pruebas de Tamizaje	Tipo de Bolsa
1972	O	NEGATIVO	triple
1974	O	NEGATIVO	triple
1975	O	NEGATIVO	triple
1976	O	NEGATIVO	triple
1977	O	NEGATIVO	triple
1978	O	NEGATIVO	triple
1979	O	NEGATIVO	CPDA
1981	A	NEGATIVO	CPDA
1983	O	NEGATIVO	CPDA
1984	O	NEGATIVO	CPDA
1986	O	NEGATIVO	CPDA
1987	O	NEGATIVO	CPDA
1988	O	NEGATIVO	CPDA
1990	O	NEGATIVO	CPDA
1991	O	NEGATIVO	CPDA
1992	B	NEGATIVO	triple
1993	O	NEGATIVO	triple
1994	O	NEGATIVO	triple
1995	O	NEGATIVO	triple
1996	B	NEGATIVO	triple
1997	B	NEGATIVO	triple
1998	O	NEGATIVO	triple
1999	O	NEGATIVO	triple
2000	B	NEGATIVO	triple
2001	O	NEGATIVO	triple
2003	O	NEGATIVO	triple
2004	O	NEGATIVO	triple
2005	O	NEGATIVO	triple
2006	O	NEGATIVO	triple
2007	O	NEGATIVO	triple
2008	O	NEGATIVO	triple
31	26 O / 1 A / 4 B		TOTAL

26 de Marzo del 2016			
Numero de Bolsa	Grupo Sanguíneo ABO	Pruebas de Tamizaje	Tipo de Bolsa
2010	O	NEGATIVO	triple
2011	O	NEGATIVO	triple
2012	O	NEGATIVO	triple
2013	O	NEGATIVO	triple
2014	O	NEGATIVO	triple
2015	O	NEGATIVO	triple
2016	O	NEGATIVO	triple
2017	O	NEGATIVO	triple
2018	O	NEGATIVO	CPDA
2019	O	NEGATIVO	CPDA
2020	O	NEGATIVO	CPDA
2021	A	NEGATIVO	CPDA
2022	O	NEGATIVO	CPDA
2023	O	NEGATIVO	CPDA
2024	O	NEGATIVO	CPDA
2025	O	NEGATIVO	CPDA
2026	A	NEGATIVO	CPDA
2027	O	NEGATIVO	CPDA
2028	A	NEGATIVO	CPDA
2029	O	NEGATIVO	CPDA
2030	O	NEGATIVO	triple
2031	O	NEGATIVO	triple
2032	O	NEGATIVO	triple
2033	O	NEGATIVO	triple
2034	O	NEGATIVO	triple
2035	O	NEGATIVO	triple
2036	O	NEGATIVO	triple
2037	A	NEGATIVO	triple
2038	O	NEGATIVO	triple
2039	O	NEGATIVO	triple
2040	O -	NEGATIVO	triple
2041	O	NEGATIVO	triple
2042	O	NEGATIVO	triple
2043	O	NEGATIVO	triple
2045	B	NEGATIVO	triple
2046	O	NEGATIVO	triple
2048	O	NEGATIVO	triple
2049	O	NEGATIVO	triple
2052	O	NEGATIVO	triple
2053	A	NEGATIVO	triple
40	34 O/ 5 A/ 1 B		TOTAL

28 de Marzo del 2016			
Numero de Bolsa	Grupo Sanguíneo ABO	Pruebas de Tamizaje	Tipo de Bolsa
2054	O	NEGATIVO	triple
2055	B	NEGATIVO	triple
2056	O	NEGATIVO	triple
2057	A	NEGATIVO	triple
2059	O	NEGATIVO	triple
2060	A	NEGATIVO	triple
2061	O	NEGATIVO	triple
2062	O	NEGATIVO	CPDA
2063	O	NEGATIVO	CPDA
2064	O	NEGATIVO	CPDA
2065	O	NEGATIVO	CPDA
2066	O	NEGATIVO	CPDA
2067	O	NEGATIVO	triple
2068	O	NEGATIVO	triple
2069	A	NEGATIVO	triple
2070	A	NEGATIVO	CPDA
2071	A	NEGATIVO	CPDA
2072	O	NEGATIVO	CPDA
2073	AB	NEGATIVO	CPDA
2074	O	NEGATIVO	CPDA
2075	O	NEGATIVO	CPDA
2076	O	NEGATIVO	CPDA
2077	O	NEGATIVO	triple
2078	O	NEGATIVO	triple
2079	O	NEGATIVO	triple
2080	O	NEGATIVO	triple
2081	B	NEGATIVO	triple
2082	O	NEGATIVO	CPDA
2083	O	NEGATIVO	CPDA
2084	O	NEGATIVO	CPDA
30	22 O / 5 A/ 2 B/ 1 AB		TOTAL
29 de Marzo del 2016			
Numero de Bolsa	Grupo Sanguíneo ABO	Pruebas de Tamizaje	Tipo de Bolsa
2086	A	NEGATIVO	triple
2087	O	NEGATIVO	triple
2088	O	NEGATIVO	triple
2089	O	NEGATIVO	triple
2090	O	NEGATIVO	triple
2091	O	NEGATIVO	triple
2092	O	NEGATIVO	CPDA
2093	A	NEGATIVO	CPDA
2094	O	NEGATIVO	CPDA

2095	O	NEGATIVO	CPDA
2096	O	NEGATIVO	CPDA
2097	O	NEGATIVO	CPDA
2098	O	NEGATIVO	CPDA
2099	O	NEGATIVO	CPDA
2100	O	NEGATIVO	CPDA
2101	O	NEGATIVO	CPDA
2102	O	NEGATIVO	CPDA
2104	O	NEGATIVO	CPDA
2105	O	NEGATIVO	triple
2106	O	NEGATIVO	triple
2107	O	NEGATIVO	triple
2110	O	NEGATIVO	triple
2111	O	NEGATIVO	triple
2112	O	NEGATIVO	triple
2113	O	NEGATIVO	triple
2114	O	NEGATIVO	triple
2115	O	NEGATIVO	triple
2116	O	NEGATIVO	triple
2117	O	NEGATIVO	triple
2118	O	NEGATIVO	triple
2119	O	NEGATIVO	triple
31	29 O/ 2 A		TOTAL
30 de Marzo del 2016			
Numero de Bolsa	Grupo Sanguíneo ABO	Pruebas de Tamizaje	Tipo de Bolsa
2121	O	NEGATIVO	triple
2123	O	NEGATIVO	triple
2124	O	NEGATIVO	triple
2125	A	NEGATIVO	triple
2126	O	NEGATIVO	CPDA
2128	O	NEGATIVO	CPDA
2129	B	NEGATIVO	CPDA
2130	O	NEGATIVO	CPDA
2131	O	NEGATIVO	CPDA
2132	A	NEGATIVO	CPDA
2133	O	NEGATIVO	CPDA
2134	O	NEGATIVO	CPDA
2135	O	NEGATIVO	CPDA
2136	A	NEGATIVO	CPDA
2137	O	NEGATIVO	CPDA
2138	B	NEGATIVO	triple
2139	O	NEGATIVO	triple
2140	A	NEGATIVO	triple
2141	O	NEGATIVO	triple

2142	O	NEGATIVO	triple
2143	O	NEGATIVO	triple
2144	O	NEGATIVO	triple
2146	O	NEGATIVO	triple
23	17 O / 4 A / 2 B		TOTAL
31 de Marzo del 2016			
Numero de Bolsa	Grupo Sanguíneo ABO	Pruebas de Tamizaje	Tipo de Bolsa
2147	B	NEGATIVO	triple
2148	O	NEGATIVO	triple
2149	O	NEGATIVO	triple
2150	O	NEGATIVO	triple
2151	O	NEGATIVO	triple
2152	A	NEGATIVO	triple
2153	B	NEGATIVO	triple
2154	A	NEGATIVO	CPDA
2155	A	NEGATIVO	CPDA
2156	O	NEGATIVO	CPDA
2157	O	NEGATIVO	CPDA
2158	O -	NEGATIVO	CPDA
2159	O	NEGATIVO	CPDA
2160	B	NEGATIVO	CPDA
2161	A	NEGATIVO	CPDA
2162	A	NEGATIVO	CPDA
2163	A	NEGATIVO	CPDA
2166	O	NEGATIVO	triple
2167	O	NEGATIVO	triple
2168	O	NEGATIVO	triple
2169	O	NEGATIVO	triple
21	12 O / 6 A / 3 B		TOTAL

2.4.2. Sistematización de Cómputo

Para el procesamiento de la información del trabajo, se utilizó la siguiente sistematización:

- Para los textos e información del trabajo investigación se utilizó el programa de Microsoft Word 2010.
- Representación de los datos a través de tablas estadísticas y gráficos el Excel 2010.
- Análisis e interpretación de los resultados de acuerdo a los indicadores de cada variable y el problema principal.

CAPITULO III: RESULTADOS

3.1. Resultados de la variable 1: **EXTRACTO *Lupinus mutabilis* Sweet.**

Tabla N°1: Resultados de la concentración del extracto de *L. mutabilis* Sweet.

	Extracto de <i>L. mutabilis</i> Sweet.		
	Concentración del Extracto		
	10%	40%	100%
N° de muestras	176	176	176
TOTAL: 176			

DESCRIPCIÓN E INTERPRETACIÓN

La tabla N°1 muestra el número de muestras empleadas para cada sub indicador de la concentración del extracto de *L. mutabilis* Sweet, con respecto al número de muestras analizadas, las cuales son un total de 176 muestras.

Tabla N°2: Resultados de la temperatura del extracto de *L. mutabilis* Sweet.

	Extracto de <i>L. mutabilis</i> Sweet.	
	Temperatura del Extracto	
	4°C	25°C
N° de muestras	176	176
TOTAL : 176		

DESCRIPCIÓN E INTERPRETACIÓN

La tabla N°2 muestra el número de muestras empleadas para cada sub indicador de la temperatura del extracto de *L. mutabilis* Sweet, con respecto al número de muestras analizadas, las cuales son un total de 176 muestras.

3.2. Resultados por indicador de la variable 2: HEMAGLUTINACIÓN

Tabla N°3: Resultados por el Fenotipo ABO de la Hemaglutinación Directa en tubo:

Fenotipo ABO	N° de Muestras	
	Fi	%
A	23	13.07
B	12	6.82
O	140	79.55
AB	1	0.56
TOTAL	176	100

DESCRIPCIÓN E INTERPRETACIÓN

La tabla N°3 muestra el número de muestras empleadas para cada sub indicador del Fenotipo ABO según el Servicio de Banco de Sangre del HNCASE, las cuales son un total de 176 muestras divididas en: fenotipo A; 23 muestras (13.07%), fenotipo B; 12 muestras (6.82%), fenotipo O; 140 muestras (79.55%) y el fenotipo AB con 1 muestra de las 176 de la población total (0.56%).

3.3. Resultados del Problema de Investigación

TABLA N° 4:

Fenotipo ABO	Concentración del extracto			Temperatura del extracto	
	10%	40%	100%	4°C	25°C
“A”	No Aglutina	No Aglutina	No Aglutina	No Aglutina	No Aglutina
“B”	No Aglutina	No Aglutina	Aglutina	Aglutina	No Aglutina
“O”	No Aglutina	No Aglutina	No Aglutina	No Aglutina	No Aglutina
“AB”	No Aglutina	No Aglutina	Aglutina	Aglutina	No Aglutina
TOTAL: 176 muestras					

DESCRIPCIÓN E INTERPRETACIÓN

La tabla N°4 muestra la relación entre los indicadores de la condición del ensayo del extracto de *L. mutabilis* Sweet frente a cada fenotipo de la muestra de 176 bolsas de donación.

Se puede observar que para el fenotipo “B”, la concentración de 100% a la temperatura de 4°C permite su aglutinación. Mientras que para las demás células de diferente fenotipo no se produce la reacción de hemaglutinación.

TABLA N° 5: Tabla en relación al grupo ABO "B" respecto al grado de aglutinación según su concentración y temperatura adecuada (Condición del ensayo).

Grado de Aglutinación	N° de muestras fenotipo B	
	fi	%
1/2 +	10	76.92
1 +	2	15.38
2 +	1	7.70
3 +	0	0
4 +	0	0
Hemólisis	0	0
TOTAL	13	100

DESCRIPCIÓN E INTERPRETACIÓN

La tabla N°5 muestra el grado de significancia entre el grado de aglutinación del extracto de *L. mutabilis* Sweet y el número de muestras con fenotipo B (13 muestras de sangre de bolsas de Donantes sanos). Se puede observar que para el fenotipo "B", la aglutinación se produce en diferentes intensidades; 10 de las 13 muestras con células "B" aglutinaron solo a 1/2 + en la escala visual, 2 de ellas aglutinaron a 1+ mientras una de ellas aglutinó al grado de 2+.

3.4. Discusión de los Resultados

3.4.1. Discusión de los Resultados a nivel de la Variable 1:

Extracto de *L. mutabilis* Sweet.

El extracto salino de *L. mutabilis* Sweet en ciertas condiciones como son; una concentración (por saturación con sulfato de amonio) al 100% y una temperatura de 4°C, que resulto ser menos sensible que la hemaglutinación estudiada por Falcón y Beeckmans que uso lectinas de tres especies de lupinos diferentes a la estudiada que reaccionaron al 80%. Esto probablemente se debe a la que las lectinas estudiadas por Falcón y Beeckmans poseen una mayor avidéz a la estudiada.

3.4.2. Discusión de los Resultados a nivel de la Variable 2

La hemaglutinación de los eritrocitos humanos es variada en la investigación, por ello se evalúa su intensidad en 1+, 2+ 3+, 4+, hemolisis y como negativo. Así mismo, Rojas y Narda, como otros autores evalúan la hemaglutinación solamente como positiva y negativa, dando una menor información del grado de unión de los dominios lectina – carbohidrato debido a que los estudios anteriores enfocaban demostrar solamente su efecto aglutinante.

3.4.3. Discusión de los Resultados del Problema

El extracto de *L. mutabilis* Sweet tiene un efecto aglutinante en los eritrocitos humanos, de la misma manera que Rodríguez y otros autores, los cuales obtuvieron un comportamiento aglutinante visible a las células estudiadas debido a las uniones específicas y amplias que poseen las lectinas a diferentes carbohidratos de las membranas celulares.

Conclusiones

PRIMERA: El extracto de *L. mutabilis* Sweet en las condiciones adecuadas; Concentración al 100% y Temperatura a 4°C, permite que la aglutinación se produzca, y por ende, tenga un efecto alto en el ensayo.

SEGUNDA: La hemaglutinación de los eritrocitos humanos se determinó, según su intensidad, en 1/2+, 1+ y 2+ en el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo, siendo ½ + el grado de visualización principal para las 13 muestras de eritrocitos con fenotipo "B" (7.38%).

TERCERA: El extracto de *L. mutabilis* Sweet posee un efecto positivo pero de baja intensidad en la hemaglutinación de los eritrocitos humanos del tipo "B", mientras que para los grupos "A" y "O" no presenta aglutinación, lo que la hace selectiva y de buen uso como proyección a un hemoclasificador. Quedando valida la hipótesis de estudio en cuanto a la reactividad pero nula en cuanto a la intensidad.

Recomendaciones y/o Sugerencias

PRIMERA: Se recomienda a futuros investigadores poder realizar más estudios de la actividad hemaglutinante del tarwi con purificación de la lectina para poder obtener mejores resultados en cuanto al grado de aglutinación para su visualización

SEGUNDA: Se recomienda a los futuros investigadores también trabajar con diferentes temperaturas a las establecidas en el trabajo.

TERCERA:A su vez, se recomienda a interesados en seguir las investigaciones sobre lectinas, buscar un método para desengrasar estas semillas.

Referencias Bibliográficas

1. Steven-E. Jacobsen, Ángel Mujica. El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. En: M. Moraes R., B. Ollgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev. Botánica Económica de los Andes Centrales. La Paz, 2006; P. 458-482.
2. Eduar Ortega-David, Aida Rodríguez, Arturo David, Ángel Zamora-Burbano. Caracterización de semillas de lupino (*Lupinus mutabilis*) sembrado en los Andes de Colombia. Acta Agron. vol.59. 2010.
3. Zegarra Vilchez G. Actividad deterrente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y Tarwi. [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Pontificia Católica del Perú; Lima; 2010.
4. González León G, Caso de Armas D, González Chávez A. Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas. Ciencias Médicas [En línea]. 2011. [fecha de acceso 26 de noviembre de 2015]; 15(2). URL Disponible en: <http://scielo.sld.cu/>.
5. Hernández Rivera E. Efecto citotóxico de una fracción rica en lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) sobre células cancerígenas. [En línea]. México. 2015. [fecha de acceso 3 de diciembre de 2015]. URL Disponible en: <http://hdl.handle.net/>.
6. Nathan Sharon. Lectins: From obscurity into the limelight. Protein Science. [En línea]. USA. 1998. [fecha de acceso 17 de setiembre de 2015]; 72042-2048. URL Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com>.
7. Hernández Herrero G, Moreno A, Gonzalez, A. Porras, Chavarino, F. Zaragoza. Tratado de Medicina Farmacéutica. [En línea]. Madrid: Panamericana. 2010. [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015]. URL Disponible en: <https://books.google.com.pe>.

8. Hernández Cruz P, Pérez Campos E, Martínez Martínez L, Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB; [En línea]. 2005. [fecha de acceso 26 de noviembre de 2015]; 24 (1): 21-27. URL Disponible en: <http://www.uacj.mx>.
9. Irvin E. Liener, Nathan Sharon, Irwin J. Goldstein. The Lectins: properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine. [En línea]. Orlando, Florida: AcademicPress. 1986. [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015]. URL Disponible en: <https://books.google.com.pe>.
10. Ruiz Álvarez V, Boffill Cárdenas M, González González O, Masjuan del Pino M, Blanco Machado F. Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. InvestBiomed[En línea]. Cuba. 2005 [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015] 24(1):5-13. URL Disponible en: <http://www.bvs.sld.cu>.
11. Mendoza W, Gandolfo L, Ponce L, Novello J, Marangoni S. Estudios estructura y función de una lectina aislada de semillas de *Caesalpiniaspinosa kuntze*(tara). IDESIA [En línea]. Chile 2007. [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015] 25 (2); 49-58. URL Disponible en:<http://www.scielo.cl>.
12. TAGUE, B.W., CHRISPEELS, M.J. The plant vacuolar protein, phytohemagglutinin, is transported to the vacuole of transgenic yeast. CIAT [En línea]. USA 1987. [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015] 105 (5); 1971-1979. URL Disponible en:<http://www.sidalc.net>.
13. Gallego del Sol F, S. Nagano C, S. Cavada B, H. Sampaio A, Sans L, Calvete J. Lectinas. Investigación y Ciencia. 2006. 58-67.
14. JONAH G. LI and EDWIN E. OSGOOD. A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or

marrow with a phytohemagglutinin from red beans (*Phaseolus vulgaris*). BloodJournal.[En línea].USA. 1949. [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015] 4: 670-675. URL Disponible en: <https://www.researchgate.net>.

15. Shirolijima, MiyakoKimura, KiyokoShiba. New detection method after cellulose acetate membrane isoelectric focusing: Activity staining for lactate dehydrogenase, detection for sugar chains using lectin and simple Western blotting. JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS. [En línea]. Bunkyo. 1999. [fecha de acceso 19 de setiembre de 2015] 13(5): 234- 240. URL Disponible en: <https://www.researchgate.net>.
16. AranibalMargni R. Inmunología e Inmunoquímica. 5 ed. Argentina. Medica Panamericana. 1996.
17. Aguilar-García V. Reacciones de aglutinación [En línea].GacMédMéz. 2004. [fecha de acceso 20 de setiembre de 2015]. 140 (3), 2004. URL Disponible en: <http://www.medigraphic.com>.
18. Garibay Escobar A. Manual de Prácticas de Inmunología. Hermosillo, Sonora .UniSon. 2006.
19. Bases genéticas y moleculares del sistema de grupo sanguíneos ABO. [Base de datos en línea]. Fumiichiro Yamamoto. [Fecha de acceso 20 de setiembre de 2015]. URL Disponible en: <https://sites.google.com/site/gruposanguineoab0>.
20. Eva D. Quinley. Inmunohematology: Principles and Practice. 3 ed. Baltimore. ThePoint. 2011.
21. Young-Zoon Yoon, Ha Hong, Aidan Brown, Dong Chung Kim, Dae Joon Kang, Virgilio L. Lew, Pietro Cicuta. Flickering Analysis of

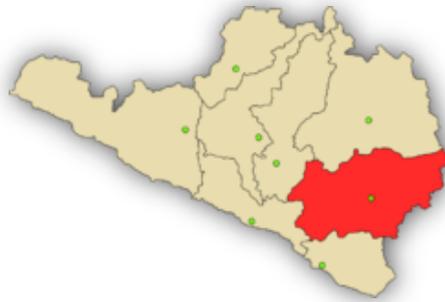
- Erythrocyte Mechanical Properties: Dependence on Oxygenation Level, Cell Shape, and Hydration Level. *Biophys.* [En línea]. Philadelphia. 2009. [fecha de acceso 20 de setiembre de 2015] 16; 97(6): 1606–1615. URL Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
22. Micucci H., Camps E. *Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas*. Argentina, 1900.
 23. Abbas, K. A, *Manual Técnico*, 13 ed, 2001, Editorial Mc Graw Hill; 257, 277-293, 666, 676-678.
 24. De Amat Herbozo C. *Determinación de la actividad mitogénica in vitro del extracto de Lectinas de semillas de *Lupinusmutabilis* Sweet (tarwi) sobre poblaciones de linfocitos humanos de sangre periférica*; 2015.
 25. Falcón, A.; Beeckmans, Sonja; Van Driessche, E. *Investigation on the haemagglutinating activity occurring in three species of lupins*. 2000. 21(1); 41-45.
 26. Guillaume St-Pierre, ValérieMilot, Sachiko Sato. *Ensayo de hemaglutinación* [En línea]. 2014. [fecha de acceso 20 de setiembre de 2015]. URL disponible en: <http://jcgdb.jp/GlycoPOD/protocolShow.action?nodeId=t135>.

Anexos

8.1. Anexo 1: Mapa de Ubicación



Mapa del Perú – Región
Arequipa



Mapa de la región Arequipa –
Provincia Arequipa



Mapa de la provincia Arequipa
– Distrito cercado.

Ubicación HNCASE.

8.2. Anexo 2: Instrumento

Ficha de Hemaglutinación

FICHA DE HEMAGLUTINACION CON EL EXTRACTO DE <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	
Número de muestra	
ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	
Concentración al 10%	
Concentración al 40%	
Concentración al 100%	
ESTUDIO DE LA TEMPERATURA DEL EXTRACTO	
4°C	
25°C	

FICHA DE HEMAGLUTINACION CON EL EXTRACTO DE <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	
Número de muestra	
Fenotipo ABO designado en Banco de Sangre	
ESTUDIO DE LA HEMAGLUTINACIÓN	
Extracto de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i>	
Control Antisuero "A"	
Control Antisuero "B"	
Control Antisuero "O"	
Control Negativo (Suero Fisiológico)	

8.3. Anexo 3: Protocolo o Manual del Instrumento

MÉTODO DE PREPARACIÓN Y UTILIZACIÓN DE LECTINAS

American Association of Blood Banks. TECHNICAL MANUAL – Vengelen-Tyler, Virginia etal. USA. 13ava edición 2001. Pág. 676

Reactivos:

- Semillas: las semillas no procesadas de fabáceas u otro objeto de estudio.

Procedimiento:

1. Moler las semillas en un procesador de alimentos hasta que las partículas tengan un aspecto de arena gruesa. También pueden triturarse en un molidero.
2. Colocar las semillas molidas y a tres cuartos veces su volumen en solución salina 0,9% en un tubo de ensayo grande u otro recipiente.
3. Incubar a 4^oc durante 14 a 20 horas.
4. Transferir el líquido sobrenadante a otro recipiente y centrifugar a 1200 por 10 minutos.
5. Recolectar y filtrar el sobrenadante.

Notas:

Para facilitar la pulverización de las semillas duras, dejarlas varias horas en remojo en solución salina. Es importante no cerrar el recipiente en forma hermética porque algunas semillas liberan aire al hidratarse, de manera que podría estallar.

Los extractos salinos guardarse en refrigeración durante varios días, o congelarse y durar indefinidamente.

PROTOCOLO DE AGLUTINACIÓN DE HEMATÍES CON LECTINAS

Autores: Guillaume St-Pierre, Glycobiology y de laboratorio Bioimagen, Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas, CHUQ, Universidad Laval, Quebec.

Valérie Milot, Glycobiology y de laboratorio Bioimagen, Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas, CHUQ, Universidad Laval, Quebec

Sachiko Sato, Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas Glycobiology y de laboratorio Bioimagen, CHUQ, Universidad Laval, Quebec

Introducción:

Cuando se extraen lectinas solubles, se recomienda usar el ensayo de hemaglutinación como uno de los procedimientos de control de calidad. Además, las actividades de las lectinas purificadas deben ser verificadas rutinariamente por este método. Este método se puede utilizar para detectar rápidamente cualquier inhibidor de lectinas. Los glóbulos rojos puede ser estable por lo menos un mes, pero es muy recomendable para comprobar la calidad de las células antes de la utilización.

Reactivos:

- PBS, Solución Salina u otro diluyente que no provoque hemolisis o altere a los glóbulos rojos.

Material y Equipos:

- Tubos de ensayo de 13 x 100
- Pipetas
- Punteras
- Centrífuga (para tubos de 50 ml)
- Incubadora

- Refrigerador

Muestra biológica:

- Glóbulos rojos

Método:

3. Preparación de glóbulos rojos.

4. Recoger 10 ml de sangre en tubos de heparina
5. Centrifugar a 3.500 rpm 5 min
6. Retirar el plasma y todo lo posible de la capa leucocitaria.
7. Lavar los glóbulos rojos 3 veces en PBS o solución salina (centrifugar 3 minutos entre cada lavado).
8. Suspender los glóbulos rojos al 5% en PBS o Solución Salina
9. Conservar a 4°C, viabilidad de 1 mes.

4. Calibración de los glóbulos rojos

- a. En 5 pocillos o tubos rotulados adicionar 95uL de PBS o SSF.
- b. Adicionar respectivamente 5, 10, 15, 20 y 25 uL de los glóbulos rojos preparados a cada pocillo o tubo rotulado.
- c. Incubar a 37°C por 30 minutos.
- d. Incubar a 4°C por 2 horas

Resultados posibles: a) Botón apretado integro; Negativo b) Botón disgregante no integro: Positivo. (Anexo)

1. Ensayo de hemaglutinación

- a. Colocar 50uL del concentrado del extracto de la lectina.
- b. Agregar 1 gota de la suspensión al 5% (50uL) con el uso de la pipeta de los glóbulos rojos en estudio a cada tubo.
- c. Mezclar el contenido de los tubos con suavidad y centrifugar a 3
- d. 500 RPM por 15 segundos.
- e. Resuspender con suavidad las células y examinar en búsqueda de alguna aglutinación.
- f. Leer, interpretar y registrar los resultados.

2. Notas:

a. Calibración de las células rojas de la sangre:

Objetivo: Conocer la cantidad de glóbulos rojos para poner en cada pocillo; evitando falsos positivos

Nota 1: El volumen óptimo de la preparación de RBC es de 5 ul, según estandarización.

Nota 2: Los resultados deben ser claros después de 30 minutos, pero pueden ser más claro después de 2 horas a 4 ° C.

b. Ensayo:

Utilizamos generalmente 5 ul de RBC en cada pocillo. Los volúmenes en la siguiente sección se calculan para esta cantidad de glóbulos rojos. Si usted necesita utilizar más o menos de 5 ul de glóbulos rojos, ajustar los otros volúmenes para obtener 100 ul finales en cada pocillo o tubo.

Maldonado K. 2016. **Efecto del Extracto de *Lupinus mutabilis* Sweet en la hemaglutinación de los eritrocitos humanos del Servicio de Banco de Sangre del Hospital Nacional Carlos Alberto Segúin Escobedo, Arequipa. 2016.** Páginas 80.

Nombre del Asesor: Lic. TM. Christian Rodríguez Zamora

Disertación académica para la licenciatura en Tecnología Médica – UAP 2016