



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académica Profesional de Genética y Biotecnología

**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**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista
Biotecnóloga

AUTOR

Carolina Cecilia DE AMAT HERBOZO

ASESOR

Libertad ALZAMORA GONZALES

Lima, Perú

2015

RESUMEN

Las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) contienen, entre otros componentes, factores no nutricionales como alcaloides, taninos, lectinas, etc. El objetivo principal del presente estudio fue evaluar la capacidad mitogénica del extracto de lectinas de semillas de tarwi del ecotipo "Patón Grande" (UNALM-Otuzco, La Libertad) sobre subpoblaciones de linfocitos T humanos. Se elaboró un extracto crudo y se fraccionó por cromatografía de exclusión molecular para aislar las lectinas, las cuales se identificaron mediante hemaglutinación y SDS-PAGE. Se realizaron cultivos de células mononucleares de sangre periférica empleando diferentes concentraciones del extracto y de la fracción seleccionada. En los cultivos con extracto se evaluó la proliferación y la activación de linfocitos T por observación microscópica directa y determinación de receptor CD25, respectivamente. En los cultivos con la fracción seleccionada se determinó el índice de estimulación, el índice mitótico y se identificaron las subpoblaciones de linfocitos T mediante ensayo MTT, obtención de placas metafásicas y citometría de flujo, respectivamente. El extracto crudo y la fracción seleccionada mostraron mayor actividad hemaglutinante sobre glóbulos rojos de conejo comparado con los de carnero y humano. Se determinó que la fracción contenía una lectina de aproximadamente 43 KDa. Se evidenció proliferación y activación en los cultivos, obteniéndose $43.7 \pm 1.4\%$ ($p < 0.01$) de linfocitos T con receptor para IL-2 (CD25+) a $1 \mu\text{g/mL}$ de extracto. El máximo índice de estimulación fue de 1.22 ± 0.07 a $5 \mu\text{g/mL}$, mientras que el índice mitótico fue de 1.5%. 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. Se concluye que las lectinas del ecotipo Patón Grande tienen actividad mitogénica sobre linfocitos T y estimulan indistintamente a linfocitos T CD3+/CD4+ y CD3+/CD8+.

PALABRAS CLAVE

Lupinus mutabilis Sweet, tarwi, lectinas de tarwi, lectinas hemaglutinantes, mitógenos de linfocitos T humanos.

ABSTRACT

Lupinus mutabilis Sweet (tarwi) seeds contain, among others components, non-nutritional factors such as alkaloids, tannins, lectins, etc. The main objective of this study was to evaluate the mitogenic capability of lectins from lupine seeds of "Patón Grande" (UNALM-Otuzco, La Libertad) ecotype on human T lymphocytes. A crude extract was prepared and fractionated by size-exclusion chromatography in order to isolate lectins; those were identified by hemagglutination and SDS-PAGE. Cultures of peripheral blood mononuclear cells using different concentrations of the extract and the selected fraction were performed. In cultures with extract, proliferation and activation of T lymphocytes was evaluated by direct microscopic observation and determination of CD25 receptor, respectively. In cultures with the selected fraction, stimulation and mitotic index were determined and T cell subpopulations were identified by MTT assay, obtaining metaphases and flow cytometry, respectively. The crude extract and the selected fraction showed greater hemagglutination activity on rabbit red cells compared to those from sheep and human. We determined that the fraction contain a lectin of approximately 43 KDa. Proliferation and activation was evident in the cultures, yielding $43.7 \pm 1.4\%$ ($p < 0.01$) of T cells with the IL-2 receptor (CD25 +) at $1 \mu\text{g/mL}$ of extract. The highest stimulation index was 1.22 ± 0.07 at $5 \mu\text{g/mL}$, while the mitotic index was 1.5%. The percentage of CD3+ cells was higher, compared to the control without lectin ($p = 0.02$); whereas CD4+ and CD8+ subpopulations remained the same proportions as the control. We conclude that Patón Grande ecotype lectins presents mitogenic activity on T lymphocytes and stimulate either CD3+/CD4 + and CD3+/CD8+ T cells.

KEYWORDS

Lupinus mutabilis Sweet, tarwi, tarwi lectins, hemagglutinating lectins, human T cells mitogen.