

## PURIFICACION DE UNA FITOHEMAGLUTININA TOXICA DE LA CARAOTA NEGRA

(*Phaseolus vulgaris*) \*

Werner G. Jaffé y Karl Gaede

Departamento de Bioquímica del  
Instituto Nacional de Nutrición, y del  
Laboratorio de Bioquímica del  
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.)  
Apartado 1827, Caracas - Venezuela

Las caraotas, al igual que otras semillas de la familia de las leguminosas contienen determinadas proteínas de notable actividad biológica (4, 3). Desde hace muchos años se conoce una fitohemaglutinina de la caraota. Recientemente Rigas y Osgood (7) describieron dos factores diferentes con propiedades hemaglutinantes. Otros autores (5, 2) han observado efectos tóxicos en animales alimentados con caraotas crudas o con determinados preparados obtenidos por extracción de la harina de caraotas. Aparentemente no son los factores hemaglutinantes, preparados según el método original (7), los que causan el efecto tóxico de las caraotas crudas, ya que sus propiedades tóxicas son mínimas. Los experimentos realizados por uno de los autores (W. J.) han establecido también la toxicidad de las caraotas, la cual no puede imputarse al inhibidor de la tripsina (otra proteína) descrito por Eowman (1). Los autores procedieron por lo tanto a aislar los componentes tóxicos de la caraota a fin de obtener más datos acerca de sus propiedades.

La caraota negra (*Phaseolus vulgaris*), finamente molida, se extrae con 5 partes (p/v) de una solución al 1% de cloruro de sodio. Mediante diálisis por agua del extracto filtrado se precipita una gran cantidad de material inactivo, obteniéndose casi toda la actividad por saturación de la solución sobrenadante con sulfato de amonio. Se preparan diferentes fracciones activas por saturación fraccionada, con la misma sal, del precipitado redisoluelto.

La fracción activa principal se obtiene por precipitación, entre el 55 y 70% de saturación, del precipitado crudo dializado, previamente ajustado al pH 6,0. Repitiendo tres veces las operaciones de precipitación

y redisolución, se obtiene una proteína altamente purificada con una pureza mínima del 90%, según lo revelan los métodos de electroforesis y ultracentrifugación. aparato "Spinco" modelo H, es del  $8,89 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/voltios/seg. para una solución al 0,9% con amortiguador La movilidad electroforética, determinada mediante un de barbiturato de pH 8,6 y fuerza iónica de 0,1. El punto isoeléctrico debería encontrarse entre pH 4 y 5. La constante de sedimentación, obtenida en nuestros experimentos, para una solución al 0,6% y con el mismo amortiguador, fué del  $5,9 \times 10^{-13}$  (ultracentrifuga "Spinco" modelo E). La proteína, para la cual proponemos el nombre de "faseolotoxina A", es soluble tanto en el agua como en soluciones de cloruro de sodio al 1% y se precipita en alcohol frío al 30%. Esta proteína contiene el 13,5% de nitrógeno (Kjeldahl) y un 5,0% de grupos reductores, según se ha determinado mediante un método modificado de Somogyi-Nelson, y según cálculos refiriéndose a glucosa. Estos valores se refieren a preparaciones secadas al aire.

La saturación de la solución sobrenadante obtenida después de separar por filtración la faseolotoxina A produce otra fracción activa, llamada "fracción B", cuyo rendimiento es reducido e irregular. Aun cuando sea precipitada tres veces, esta fracción consiste de 3 componentes principales. Según lo demuestran los experimentos electroforéticos y de centrifugación realizados, no se encontró entre dichos componentes ningún compuesto con las propiedades físicas de la faseolotoxina A.

La actividad hemaglutinante se determinó con suspensiones al 0,25% de eritrocitos lavados de ovejas o ratones en una solución salina. Para ello, se mezclan 1,0

\* Traducción del artículo original "Purification of a Toxic Phytohaemagglutinin from Black Beans (*Phaseolus vulgaris*)", publicado en "Nature", (183, 1329-1330, 9-5-1959). Por gentil autorización de los Editores.

cc. de esta suspensión con 1,0 cc. de las preparaciones activas obtenidas de caraotas, en diluciones adecuadas, incubadas a 37° C durante 30 minutos y centrifugadas a 2.500 r.p.m. en una centrifuga corriente de laboratorio. La prueba de aglutinación se considera positiva cuando los eritrocitos no se suspenden al ser agitados.

Se realizaron estudios de toxicidad en ratones blancos adultos después de una inyección intraperitoneal de diluciones adecuadas de los preparados. Los resultados de estos experimentos aparecen en la Tabla No. 1.

Se han notado diferencias considerables entre la faseolotoxina A y la fracción B. Estas fracciones tienen aproximadamente la misma actividad aglutinante pero la fracción B es por lo menos tres veces menos tóxica, lo cual deja suponer que las caraotas negras no contienen un solo compuesto tóxico sino varios. La fracción B, diferente de la faseolotoxina A en cuanto a sus propiedades físicas, muestra también diferencias biológicas y, debido a su toxicidad relativamente baja, como así también a sus propiedades físicas, se parece más a la fitohemaglutinina descrita por Rigas y Osgood (7).

Las investigaciones físicas realizadas demuestran que la faseolotoxina A es un componente único y los resultados dejan suponer que tanto las propiedades hemaglutinantes como las tóxicas son debidas a la misma proteína. Esta suposición es corroborada por otros dos experimentos. Incubando una solución de 50 mg. de toxina durante 30 minutos, a 37° C, con una suspensión de 100 mg. de estroma de eritrocitos humanos en salina (6), la toxina es absorbida completamente, mientras que la parte sobrenadante de la solución no manifiesta después de la centrifugación ninguna actividad aglutinante o tóxica. Además, calentando una solución salina de faseolotoxina A de una concentración de 25 mg/cc. a 80° C, durante 60 minutos, las actividades no son destruidas totalmente, si bien la solución se torna lactescente, debido a una desnaturalización parcial y precipitación. Con todo, las actividades hemaglutinante y tóxica se reducen en las mismas proporciones, o sea hasta un 50% aproximadamente. Si se hierva la solución durante 30 minutos, ambas actividades desaparecen uniformemente por completo.

TABLA 1: PROPIEDADES FISICAS Y BIOLOGICAS DE FRACCIONES DE CARAOTAS

Fracción	Movilidad electroforética (cm <sup>2</sup> /V./seg. x 10 <sup>5</sup> )	Constante de sedimentación (S <sub>20</sub> x 10 <sup>13</sup> )	Actividad aglutinante (c) (μ gm/cc)	Actividad tóxica	
				Dosis (mg/kg) (d)	Mortalidad (e)
Faseolotoxina A	8,89 (a)	5,9 (a)	3,0	50 60 100	15/2 6/5 9/9
Faseolotoxina A después del tratamiento con estroma	—	—	00	100	4/0
Faseolotoxina A calentada a 80° C	—	—	6,0	125	7/3
Fracción B	24,5 (a)	2,3 (a)	4,0	150 200	5/2 5/3
	28,5 (a)	6,6 (a)			
	1,04 (a)	9,7 (a)			
	4,35 (b)	2,3 (b)			
	5,79 (b)	6,5 (b)			
		10,6 (b)			
		18,0 (b)			

(a) Amortiguador de barbiturato pH 8,6; μ 0,1.

(b) Amortiguador de fosfato pH 6,5; μ 0,1.

(c) Cantidad mínima de toxina que da resultados positivos.

(d) Toxina en mg/kg ratón.

(e) Número de animales utilizados en los experimentos/número de animales muertos después de la inyección.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.—Bowman, D. E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 86, 491 (1954).
- 2.—Jaffé, W. G., Experientia, 5, 81 (1949).
- 3.—Krüpe, M., "Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweisskörper (Phyttagglutinine)" (Stuttgart, 1956).
- 4.—Landsteiner, K., y Raubitschek, L., Centralb. f. Bakt., 45, 660 (1908).
- 5.—Lüning, O., y Bartels, W., Z. Lebensm. Unters. Forsch., 51, 220 (1926).
- 6.—Milgrom, F., y Layrisse, M., Nature, 182, 189 (1958).
- 7.—Rigas, D. A., y Osgood, E. E., J. Biol. Chem., 212, 607 (1955).