

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

169
24

EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA LECTINA
DE Amarantus leucocarpus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

FLOR DE MARIA R. PORRAS ORTA

310007

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

INTRODUCCION -----	1
DEFINICION -----	2
ANTECEDENTES -----	4
OBJETIVOS -----	19
MATERIAL Y METODOS -----	20
RESULTADOS -----	27
DISCUSION -----	40
CONCLUSIONES -----	45
BIBLIOGRAFIA -----	46

INTRODUCCION

La semilla de amaranto se ha utilizado en algunas regiones del interior del país desde épocas prehispánicas. Actualmente se utiliza para elaborar el dulce conocido como "alegría", y la harina que se extrae de estas semillas se utiliza en la elaboración de una serie de alimentos como el pinole, tamales, galletas, pan y tortillas.

Desde hace pocos años se ha estudiado esta planta por las cualidades alimenticias que se le atribuyen, que son comparables a las de la soya.

De la semillas de amaranto se ha extraído una glicoproteína que tiene la capacidad de aglutinar células en suspensión y puede ser de utilidad en la investigación biomédica.

Aunque se desconoce la función biológica de la lectina en la semilla se ha observado que la digestibilidad de la harina de esta semilla se incrementa a partir de la extracción de la lectina (13, 14).

En este proceso de extracción solo se pierde un 3 % del peso del material y se conserva el valor nutritivo (40).

En virtud de que las lectinas tienen importancia como herramienta en la investigación en inmunología y en el aislamiento de glicoproteínas de interés, y de que se ha observado que la extracción de la lectina de la semilla no altera su valor nutricional, consideramos interesante identificar esta lectina desde el punto de vista de su especificidad química y de sus propiedades biológicas para proponer el aprovechamiento integral de la semilla, aportando por una parte un reactivo biológico de aplicación en la investigación biomédica y por otra un alimento de alto valor nutricional.

DEFINICION

En 1948, William C. Boyd, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Boston y K.O. Renkonen de la Universidad de Helsinki, descubrieron independientemente que ciertas aglutininas presentes en plantas (o fitoaglutininas) eran específicas para grupos sanguíneos humanos. De este modo descubrieron que el extracto crudo de frijol de lima (*Phaseolus limensis*) o el de la semilla de haba (*Vicia Cracca*) aglutinan eritrocitos humanos de tipo A solamente, mientras que el extracto de otras semillas como *Lotus tetragonolobus* (espárrago) aglutina eritrocitos solo de tipo O. En 1954 W.C. Boyd propuso que estas sustancias que aglutinan específicamente grupos sanguíneos podrían ser llamadas lectinas (del latín *legere*: elegir o escoger) (11). Más adelante, después de que se descubrió la presencia de estas sustancias en otras fuentes diferentes a los vegetales, este término fue retomado por N. Sharon y H. Lis en 1972 (53) para incluir todas las proteínas de origen no inmune de plantas, animales o microorganismos. Y a partir de entonces este término se ha generalizado.

En 1980 cinco investigadores de países diferentes propusieron la siguiente definición de lectina (19):

"Una lectina es una proteína o glicoproteína, de origen no inmune que une carbohidratos, que aglutina células y/o precipita glicoconjugados."

Con las siguientes consideraciones:

-Las lectinas portan por lo menos dos sitios de unión.

-La especificidad de una lectina está definida usualmente en términos de monosacárido(s) u oligosacáridos sencillos que inhiben las reacciones de aglutinación (o precipitación, o agregación) inducidas por las lectinas.

-Las lectinas, aunque descubiertas en vegetales, también se han encontrado en muchos organismos, desde bacterias hasta mamíferos.

-Una lectina puede ser soluble en fluidos biológicos (eg. hemolinfa de invertebrados) o estar unida a membrana (eg. lectinas de hígado de conejo o de rata, magrófagos).

Aunque algunos autores no están del todo de acuerdo con esta definición -y proponen que debe de cambiarse tanto el concepto de la función de las lectinas como la propia definición (7)- es la que hasta ahora se tiene como válida.

ANTECEDENTES

En 1888 Stillmarck observó que los extractos de las semillas de *Ricinus communis* (higuerilla) aglutinaban eritrocitos. Posteriormente descubrió que era una proteína -a la cual llamó ricina- la que poseía esta propiedad. Tres años más tarde H. Hellin encontró en el extracto tóxico de la semilla de *Abrus precatorius* otra proteína que también aglutinaba células rojas, la abrina.

En 1890, Paul Ehrlich, un bacteriólogo alemán del Instituto Real de Terapia Experimental de Frankfurt, incorporó estas proteínas al estudio de la inmunología al utilizarlas como antígeno. Con estas dos sustancias Ehrlich descubrió algunos de los principios fundamentales de la inmunología, como son la existencia de la respuesta de un organismo a un antígeno y la neutralización de éste con el suero de un organismo sensibilizado con ese antígeno; así como la especificidad del antisuero contra el antígeno que lo indujo (28, 53, 54, 56).

A partir del descubrimiento de la ricina se estudiaron varias sustancias aglutinantes y sus especificidades hacia diferentes tipos de células. En 1908 Karl Landsteiner (el descubridor de los grupos sanguíneos) y H. Raubistchek encontraron que los extractos de semillas variaban en su capacidad aglutinante hacia los eritrocitos provenientes de diferentes especies de animales. El extracto de chícharo (*Pisum sativum*) aglutinaba mejor a los eritrocitos de conejo en comparación a los de carnero o pichón y demostraron que las células rojas humanas eran mejor reconocidas y aglutinadas por los extractos de frijol, que por los de chícharo o de lenteja (*Lens*

culinaris) los cuales aglutinaban débilmente a los eritrocitos humanos.

Los primeros en identificar que la interacción de las aglutininas vegetales con los eritrocitos estaba mediada por el reconocimiento de las estructuras sacarídicas de la superficie de la célula fueron J. B. Summer y S.P. Howell de la Universidad de Cornell, Ithaca, New York (54). En 1919 Summer aisló y purificó una aglutinina de las semillas de haba blanca, *Canavalia ensiformis* (concanavalina A, Con A); después, en 1935 junto con Howell descubrió su habilidad para aglutinar eritrocitos, bacterias y levaduras, y para precipitar glicógeno en solución. Más adelante ellos demostraron que esta capacidad aglutinante de la concanavalina A era inhibida con azúcar de caña y sugirieron que el efecto aglutinante podía ser la consecuencia de la relación entre la proteína de la planta con los carbohidratos de la superficie de las células rojas.

A pesar de los estudios realizados por Landsteiner y Raubistchek en 1908 se seguía pensando que las aglutininas vegetales no eran específicas. Y fue hasta 1948 que W. C. Boyd (54) de la Escuela de Medicina de la Universidad de Boston y K. O. Renkonen de la Universidad de Helsinski, descubrieron independientemente que ciertos extractos crudos eran específicos para grupos sanguíneos humanos bien determinados; como los de frijol de lima (*Phaseolus limenis*) y de haba (*Vicea craca*) que solo aglutinan eritrocitos humanos de tipo A, mientras que los extractos de *Lotus tetragonolobus* (espárrago) aglutinan solamente células rojas de tipo O. Posteriormente se encontraron lectinas específicas para otros grupos (e incluso subgrupos) sanguíneos.

Más adelante, en 1952, Winifred M. Watkins y Walter J. Y. Morgan (54) del Instituto Lister en Londres observaron que la aglutinación de los eritrocitos de tipo A por la lectina de frijol de lima (*Phaseolus limensis*) era inhibida por el azúcar N-acetil-D-galactosamina, y la aglutinación de células rojas tipo O provocada por la lectina de *Lotus tetragonolobus* (espárragos) se inhibía con el azúcar L-fucosa. Morgan y Watkins concluyeron entonces que la N-acetil-D-galactosamina y la L-fucosa eran las responsables de la especificidad de los grupos A y O respectivamente.

A principios de la década de los 60's se realizó un descubrimiento que dió gran auge al estudio de las lectinas. Peter C. Nowell de la Universidad de Pennsylvania en Philadelphia encontró que la lectina de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*) llamada fitohemaglutinina (PHA) era mitogénica, es decir, poseía la habilidad de estimular a los linfocitos a crecer y dividirse sin importar la especificidad antigénica de sus receptores (36).

Otro descubrimiento que hizo relevante la investigación de las lectinas fue el hecho por Joseph C. Aub y colaboradores del Hospital General de Massachusetts, Boston durante 1963-65. Ellos observaron la hemaglutinación preferencial que tenía la lectina de germen de trigo, WGA (*Triticum vulgaris*) por las células malignas, con respecto a células normales (2, 3, 4). Posteriormente se observó este mismo fenómeno con la concanavalina A (22) y con la lectina de frijol de soya (*Glycine max*) (52).

Estas características encontradas en las lectinas despertaron el interés de los investigadores y a partir de entonces se intensificó el estudio de sus propiedades así como la purificación de más

lectinas provenientes tanto de vegetales (27, 53) como de otras fuentes: microorganismos (5, 6, 41, 42) y animales vertebrados e invertebrados. En nuestros días se sabe bastante acerca de su distribución, características moleculares y biosíntesis; y se avanza en el estudio de su papel en la naturaleza que aún no es muy claro.

Se ha observado que las lectinas no están confinadas a los vegetales, como se creía originalmente, sino que se encuentran ampliamente distribuidas en los seres vivos, encontrándose frecuentemente sobre las superficies celulares y en las partículas intracelulares (5, 10, 29, 57). Además, se conoce que existe una gran homología entre las secuencias primarias de lectinas provenientes de fuentes relacionadas taxonómicamente demostrando que estas proteínas se han conservado a través de la evolución (56). Lo anterior habla de que las lectinas juegan un papel importante en la naturaleza.

En la década pasada se planteó que las lectinas pueden actuar como moléculas de reconocimiento (21, 57) y esta idea ha guiado estudios acerca de la importancia de su presencia en virus, bacterias y protozoarios donde se cree que intervienen en los procesos infecciosos desarrollados por estos microorganismos (29, 41, 42, 43, 57). En los vegetales, aún existe controversia acerca de la participación de estas proteínas en la simbiosis entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno (5, 29, 57). En los animales superiores se han encontrado evidencias de su participación en fenómenos tales como eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio (5, 29, 59), adhesión celular (21, 28, 29, 46), toma y muerte de células -eritrocitos viejos (32, 55), células tumorales (55, 57) y microorganismos (18, 43, 55, 57)- por parte de las células

fagocíticas , diferenciación celular (5, 6, 7, 57), organogénesis (5, 6), migración de linfocitos (29, 57) y metástasis. (29, 57).

Actualmente se ha acumulado suficiente evidencia para poder afirmar que, en efecto, las lectinas tienen un papel fundamental en el reconocimiento celular; y por tanto su actuación es determinante en la complicada red de interacciones celulares.

Las lectinas son herramientas indispensables en la investigación biomédica. Sus usos van desde la tipificación de bacterias (29) y grupos sanguíneos (29, 53) hasta auxiliares en el transplante de médula ósea en pacientes con severas inmunodeficiencias (29, 56). Las propiedades mitogénicas de algunas lectinas han sido muy importantes en el análisis de los eventos bioquímicos que se desarrollan durante la estimulación de los linfocitos in vitro y para utilizarlas como reactivo clínico en la valoración de inmunocompetencia de pacientes que sufren diferentes enfermedades infecciosas (56).

Las lectinas también se han usado en la separación de poblaciones celulares (29). Y gracias a la existencia de un gran número de lectinas con diferentes especificidades estas proteínas han servido en el estudio de carbohidratos sencillos y complejos, en solución y presentes en superficies celulares (29), así como de glicoproteínas y glicopéptidos.

EL AMARANTO

Taxonomía. La familia Amaranthaceae es considerada (al lado de otras dos familias: Chenopodiaceae, quinuas y quelites; y Polygonaceae, ("trigo sarraceno") como un "pseudocereal" debido a lo pequeño de su semilla. Esta familia comprende hierbas anuales, agresivas y de clima

cálido, con hojas simples y flores pequeñas dispuestas en espigas; contiene más de 50 géneros y alrededor de 800 especies.

El género de *Amaranthus* contiene más de 50 especies, localizadas principalmente en los trópicos y regiones templadas del mundo. Dentro del género se encuentran plantas silvestres y cultivadas.

Aunque todavía no existe un acuerdo acerca de la taxonomía del grupo Sauer (50) ha planteado que las especies cultivadas se reducen a tres: *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus edulis*. *Amaranthus hypochondriacus* se encuentra en sinonimia con *Amaranthus leucocarpus*, *Amaranthus cruentus* con *Amaranthus Paniculatus* y *Amaranthus edulis* con *Amaranthus caudatus*.

CLASIFICACION BOTANICA DE LA "ALEGRIA"

Reino	Vegetal
División	Embryophyta Siphonograma
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Subclase	Archidomidae
Serie	Centrospermae
Familia	Amaranthaceae
Género	<i>Amaranthus</i>
Especie	<i>paniculatus</i>
Variedad	<i>leucocarpus</i>

Su cultivo. La planta de amaranto fue importante para la economía primitiva de varias culturas de América y Asia que la cultivaban

extensivamente en las altiplanicies. Actualmente solo India y México conservan su cultivo en pequeñas cantidades.

En América, el cultivo de los amarantos fue importante desde tiempos remotos y las culturas prehispánicas los utilizaron como alimento (16,44). Aunque su cultivo declinó a partir del siglo XVII la distribución actual de los amarantos cultivados es un reflejo de lo anterior: la especie *Amaranthus hypochondriacus* se encuentra en México y el suroeste de los Estados Unidos de América, *Amaranthus cruentus* en Guatemala, *Amaranthus caudatus* en Perú y Bolivia principalmente (en la región de Los Andes) y *Amaranthus edulis* en Argentina. Actualmente su cultivo sigue declinando en Sudamérica de acuerdo con los trabajos de R. Lutz en 1979 (31).

En el norte de América el amaranto era utilizado por los indios de Arizona y Nuevo México (hopi y suñiz), por las tribus del norte de México (tarahumaras, yaquis, huicholes), así como por las culturas del centro y sur del país (aztecas, mayas, tepehuanos).

El cultivo de amaranto en la República Mexicana está localizado actualmente en unas cuantas regiones del país, que comprenden 12 estados y hasta hace poco se utilizaba casi exclusivamente para el consumo familiar. Sin embargo se cree que en la época precolombina, y aún antes (5000-3000 años a. de C.), este cultivo constituía una parte importante en la alimentación y la economía de las culturas de América.

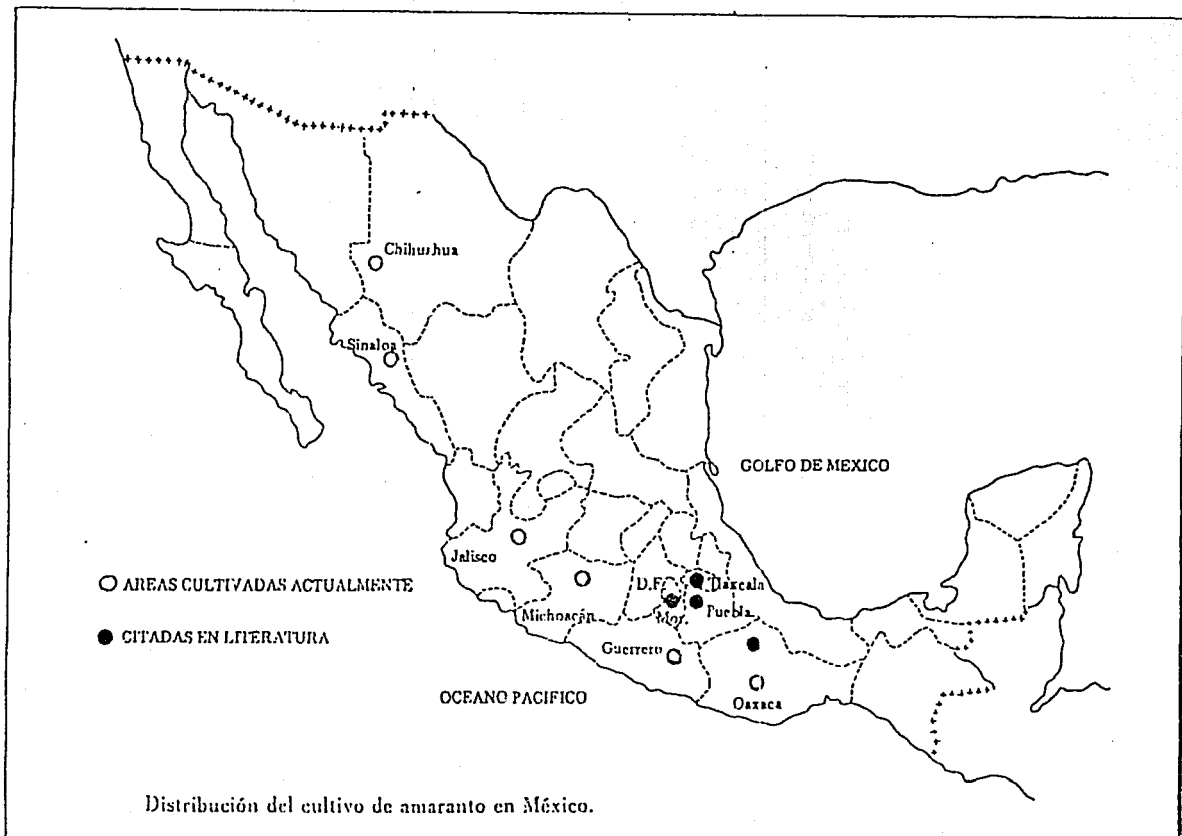
Desde hace 4000 años los indios mexicanos domesticaron el amaranto al grado que llegó a ocupar un lugar importante como alimento básico, al lado del maíz y del frijol. Moctezuma recibía 7 millones de litros de semillas de amaranto como tributo anualmente.

En la cultura azteca fue muy difundido el uso de la planta de amaranto, comían sus hojas como verdura y con sus semillas hacían diferentes alimentos como atole, tamales tortillas y pinole. También con esas semillas elaboraban idolos y amuletos que utilizaban en sus ceremonias de la siembra y la cosecha del maíz y como ofrendas para adorar a divinidades como Tlaloc y Huitzilopochtli (33).

En la actualidad, el cultivo de *Amaranthus hypochondriacus* (*Amaranthus leucocarpus*) está reducido a pequeñas zonas, de las cuales el Distrito Federal, Estado de México y Morelos (precisamente en la región que fue el corazón del Imperio Azteca) es el área más importante, y en la cual prácticamente la totalidad de la producción se destina a la fabricación del dulce conocido como "alegría". También se reporta su cultivo en pequeñas superficies de Michoacan, Jalisco, Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Durango, Guerrero, Tlaxcala, Puebla y Oaxaca (mapa 1) (1).

Su estudio. Tanto el cultivo como los usos de la planta de amaranto han despertado interés desde el siglo pasado (50: pags. 21 y 77). Sin embargo, durante las décadas de los 70's y 80's del presente siglo es cuando tiene un verdadero auge el interés por esta planta y sus propiedades (23, 40, 50: pag. 45).

En México el Centro de Estudios Economicos y Sociales del Tercer Mundo impulsó en 1978 la investigación de este género para estudios sobre su taxonomía, cultivo, composición química y potencial alimenticio. Otros centros de investigación que abrieron líneas de estudio sobre el amaranto son el Instituto Nacional de Investigaciones Agricolas de Chapingo y el Colegio de Posgraduados de



MAPA 1. ALEJANDRE 1986 (1),

la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (50: pags. 45 y 46).

Por otra parte en Estados Unidos de Norteamérica la empresa privada Rodale Press Inc., a través del Rodale Research Center, posee un programa que promueve el cultivo del amaranto desde 1975, y en 1977 organizó el primer Simposium en Amaranto (50: pag. 45). En 1983 la Agencia Norteamericana para el Desarrollo Internacional (USAID) le otorgó fondos a esta compañía para la investigación de esta planta (23).

También la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de Norteamérica (NAS-USA) se ha interesado en las investigaciones sobre el amaranto de grano desde 1981 y ha donado fondos para su investigación a 5 países: México, Guatemala, Perú Tailandia y Kenya (23).

Otros países como la India, Inglaterra, Alemania, Japón, Australia, Suecia, etc. han incluido el amaranto entre sus líneas prioritarias de estudio (50: pags. 45 y 46).

El interés, que durante este siglo ha despertado la planta de amaranto, así como su cultivo, se ha debido en gran parte al conocimiento acumulado acerca del papel que ha jugado como alimento tanto en culturas antiguas como actuales en diversas partes del mundo (América, India, Pakistan, China, etc.) (50: pags. 43-45); así como a la posibilidad de restaurarlo como cultivo masivo debido a su potencial alimenticio.

El valor nutritivo del amaranto se ha comprobado a partir de los intensos estudios que se han realizado sobre su composición química por parte de investigadores de diferentes países. En estos estudios

se han determinado proteínas, aminoácidos esenciales, minerales y vitaminas de las diferentes partes que constituyen a la planta (tallo, hoja, semilla) (9, 50: pags. 11-134).

Existe información de análisis bromatológico de las semillas solamente de algunas especies que han sido utilizadas como alimento; todas pertenecen al género *Amaranthus* (cuadros 1 y 2) (9).

CUADRO 1. Análisis bromatológico de semillas de distintas especies de amaranto (g/100g, base seca) (9).

ESPECIE	PROTEINA CRUDA (N x 5.85)	EXTRACTO ETEREO	FIBRA CRUDA	CENIZA
<i>A. caudatus</i>	14.9	6.9	4.2	3.2
<i>A. cruentus</i>	17.3	7.9	4.4	3.3
<i>A. edulis</i>	15.8	8.1	3.2	3.2
<i>A. flavus</i>	15.9	4.4	5	3.7
<i>A. gangeticus</i>	15.1	5.1	5.4	3.5
<i>A. leucocarpus</i> (crudo)	15.4	6.4	3.1	2.9
<i>A. leucocarpus</i> (tostado)	14.8	7.2	3	3
<i>A. paniculatus</i>	15.5	4.9	5	4.1
<i>A. retroflexus</i>	13.2	6.4	6.4	3.1

Sobre la calidad de la proteína de la semilla del amaranto se puede calificar como rica en lisina y aminoácidos aromáticos y azufrados, ligeramente pobre en valina, isoleucina y treonina y limitante en leucina (cuadro 3) (9). En relación con el patrón provisional de aminoácidos FAO/OMS, la calificación o puntaje químico

se encuentra entre 73 y 80% correspondiendo la más alta al *Amaranthus hypochondriacus* o *leucocarpus* (9).

CUADRO 2. Composición general de las semillas de amaranto (g/100g) (9).

DETERMINACION	Base húmeda	Base seca
Humedad	7.8	0
Extracto libre de nitrógeno(HC)	65-67	70-72
Proteína cruda (N x 5.85)	12-16.5	13-17.8
Extracto etéreo	3-6	4.4-8.1
Fibra cruda	3-4	3.2-6.4
Cenizas	365-375	3.2-4.1
Energía (KCAL)		395-408

CUADRO 3. Concentración de los aminoácidos indispensables en la proteína de semillas de distintas especies de amaranto (mg/16mg N) (9).

	leucocarpus	caudatus	cruentus	edulis	patrón*	
Valina	4.0	4.6	4.1	3.6	3.8	5
Isoleucina	3.8	4.1	3.6	5.1	3.3	4
Leucina	6.0	6.6	5.3	3.4	5.1	7
Treonina	3.6	3.9	3.5	6	3.2	4
Am.Ac. Aromáticos	8.0	10.0	6.2	4	6.6	6
Mercapto Am. Ac.	9.4	8.3	4.7	5.1		3.5
Lisina	6.4	3.8	5.3		4.8	5.5
Triptófano	1.0	0.45			0.9	1

*Patrón provisional FAO/OMS 1973.

De los minerales presentes en la semilla de amaranto existe un contenido relativamente alto de calcio, fosforo, zinc, hierro y sobretodo de magnesio (cuadro 4) (9). En cuanto a las vitaminas destaca moderadamente la tiamina (cuadro 5) (9).

Cuadro 4. Contenido de algunos elementos inorgánicos en semillas de amaranto (mg/kg, o ppm) (9).

Calcio	2660-3700
Fósforo	3970-4910
Hierro	52-70
Magnesio	2700
Boro	9
Cobre	6-7
Manganeso	29-31
Silicio	27-30
Zinc	35

Cuadro 5. Concentración media de algunas vitaminas en las semillas de amaranto (mg/100g) (9).

Tiamina	0.25-0.90
Riboflavina	0.03-0.29
Niacina	1.0-2.1
Vitamina C	1.7-2.8

En lo que se refiere a la composición química de las hojas se tiene menos información, la cual se resume en el cuadro 6 (9).

CUADRO 6. Perfil bromatológico de las hojas de amaranto en base seca (g/100g).

Cenizas	6-10g
Fibra cruda	3-5g
Proteínas	6.5-7.5g
Carbohidratos	80g
Tiamina	2g
	(mg/100g)
Riboflavina	0.15mg
Niacina	1.4mg
Ac. ascórbico	80mg
Calcio	267mg
Fósforo	67mg
Hierro	3.9mg

La cuantificación de aminoácidos de la proteína aislada de hojas de amaranto muestra una composición muy cercana a la del patrón, con un puntaje químico esencialmente de 100.

Otro aspecto que se ha estudiado en algunas especies de *Amaranthus* es la presencia de lectinas en sus semillas así como su especificidad, sus propiedades biológicas y su posible uso como

herramineta en la investigación biomédica (13, 14, 15, 24, 40, 45, 48, 49, 51,).

En *Amaranthus leucocarpus* se ha observado que al extraer la lectina de sus semillas aumenta la digestibilidad de la harina y sólo se pierde el 3% del peso del material sin afectar su valor nutritivo (13, 14, 40).

Debido a la gran aplicación que tienen las lectinas se considera importante conocer más acerca de la especificidad hacia azúcares, oligosacáridos y otros glicoconjugados, y los efectos biológicos que presenta la lectina de *A. leucocarpus*.

OBJETIVOS

- a) Aislar la lectina de la semilla de *Amaranthus leucocarpus*.
- b) Caracterizar químicamente la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.
- c) Identificar la especificidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por estructuras sacarídicas.

MATERIAL Y METODOS

Las semillas de *Amaranthus leucocarpus* se obtuvieron en Tulyehualco, México, D. F.

Los eritrocitos humanos se obtuvieron de donadores sanos en el laboratorio del Banco Central de Sangre del IMSS con la colaboración del Dr. Hector Rodríguez Moyado.

Los ratones utilizados fueron hembras Balb/c de 6 semanas de edad con un peso de 25-30 grs., provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

Los azúcares estándar así como las glicoproteínas utilizadas fueron obtenidos en Sigma (Sigma Chemicals, St. Louis M. USA).

Los glicanos y glicopéptidos fueron donados por el Dr. H. Debray de la Universidad de Ciencias y Técnicas de Lille, Francia.

Las placas de microtitulación utilizadas fueron adquiridas en Falcon (USA).

PREPARACION DEL EXTRACTO CRUDO

Se molió la semilla del amaranto hasta obtener un polvo fino. A 10 grs. del material pulverizado se le añadieron 100 ml. de Solución Salina Isotónica (NaCl 0.9% en agua p/V, SSI). Esta mezcla se agitó durante 24 hrs. a 4°C. Se separó la parte líquida por decantación y posteriormente se centrifugó a 10 000 RPM durante 10 minutos para eliminar el material particulado restante. El sobrenadante que constituye el extracto crudo se almacenó a 4°C para su conservación.

PURIFICACION DE LA LECTINA

En base a estudios preliminares con el extracto crudo, donde se observó que la fetuina es uno de los mejores inhibidores de la actividad aglutinante hacia eritrocitos humanos, la purificación de la lectina de amaranto se realizó por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de 10 x 1 cm., conteniendo fetuina Sepharosa 4B (obtenida en Sigma Fine Chemicals St. Louis M. USA). La columna fue lavada exhaustivamente con SSI, agua y ácido acético al 3%, finalmente, previo a la adición de la muestra, se equilibró con SSI. Posteriormente se aplicaron 10 ml. de extracto crudo de la lectina conteniendo 75 mg. de proteína; el flujo de la columna se ajustó a 10 ml/h y se colectaron fracciones de 3 ml cada una. La fracción cruda de *Amaranthus leucocarpus* no retenida en la columna fue eluida con SSI. Más adelante se eluyó con la adición de agua destilada una fracción conteniendo proteína y que presenta actividad aglutinante (Figura 1). A cada fracción obtenida se le ajustó la fuerza iónica con NaCl 1M y se les determinó actividad aglutinante y absorbancia a 280 nm. Las fracciones fueron colectadas por separado y liofilizadas hasta su utilización.

La concentración de proteínas, presentes tanto en el extracto crudo como en la fracción purificada, se determinó por medio del método descrito por Lowry (30).

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AGLUTINANTE

Se llevaron a cabo ensayos sobre la actividad aglutinante de la lectina utilizando eritrocitos humanos de diferentes tipos sanguíneos: A1, A2, B, O, M, N, Le^a, Le^b normales. Con el fin de determinar si sobre la membrana del eritrocito existen estructuras sacarídicas enmascaradas por proteínas de la membrana celular o por los residuos de ácido siálico, -como se ha reportado para otros sistemas utilizando otras lectinas (45)- se realizaron ensayos de hemaglutinación con glóbulos rojos tratados con tripsina (Boehringer Mannheim Ec 3.4.21.4) y neuraminidasa (Vibrio cholerae, Boehringer Mannheim EC 3.2.1.18).

El tratamiento de los eritrocitos tripsinizados se realizó añadiendo 200 μ g de tripsina disueltos en 100 μ l de SSI con 5mM de Ca y Mg a 0.5 ml de paquete eritrocitario e incubando esta mezcla a 37°C durante 45 minutos.

Los eritrocitos tratados con neuraminidasa se obtuvieron agregando 0.1 unidades de enzima disuelta en 100 μ l de SSI a 1 ml de paquete de eritrocitos e incubando 1 hr a 37°C.

Para realizar los ensayos de hemaglutinación se utilizaron placas de microtitulación (Falcon, USA) en las que se colocaron 25 μ l de SSI y se agregaron 25 μ l del extracto crudo, diluyendolo de forma seriada. Se incubó durante 30 min y posteriormente se agregaron 25 μ l de eritrocitos humanos al 2% en SSI. Finalmente, se incubó a temperatura ambiente durante 2 hrs, después de las cuales se tomó la lectura por observación directa.

El título de la actividad aglutinante se define como el inverso de la última dilución con actividad aglutinante.

DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA

Para el estudio de la especificidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se hicieron pruebas de inhibición de la actividad aglutinante con diferentes carbohidratos: D-galactosa, D-glucosa, L-fucosa, D-manosa, D-manosamina, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina y ácido N-acetil neuramínico. También se probó la capacidad inhibitoria de algunas glicoproteínas, oligosacáridos y glicopéptidos relacionados. Se utilizaron eritrocitos humanos tipo O.

Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación. Para la inhibición con monosacáridos se diluyó de manera seriada la lectina en SSI y se agregaron 25 μ l del azúcar correspondiente a una concentración de 0.1 M a cada pozo de la placa, se dejó incubar la mezcla durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron los eritrocitos al 2 % y se incubó durante 2 hrs más. La inhibición de la actividad se identifica al comparar el título de la actividad aglutinante con el control sin el azúcar.

En los ensayos con glicoproteínas, oligosacáridos y glicopéptidos se colocaron en las placas de microtitulación 25 μ l de la lectina con un título de 4 unidades hemaglutinantes (UHA), se agregaron 25 μ l de la solución de glicoproteínas o sus derivados (10mg/ml) diluyendolos de forma seriada y después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 25 μ l de la suspensión de eritrocitos al 2 %. Se incubó durante 2 horas más y se

observó la concentración mínima de cualquiera de las glicoproteínas y sus derivados capaz de inhibir la actividad aglutinante de la lectina.

DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

Determinación del Peso Molecular por filtración en gel. El peso molecular de la lectina en estado nativo se determinó en una columna de cromatografía 100 x 1.2 cm conteniendo Sephadex G-100 equilibrada previamente con SSI, a una velocidad de flujo de 9ml/h. La columna utilizada estaba previamente calibrada con proteínas de diferente peso molecular: azul Dextrán 2×10^6 Da, albumina sérica bovina 68000 Da, ovoalbumina 45000 Da, 1/2 hemoglobina 31000 Da, mioglobina 18000 Da y citocromo c 10400 Da. El peso molecular de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se calculó comparando su volúmen de exclusión con el de estas proteínas. (Figura 2). A cada fracción eluída se le determinó absorbancia a 280 nm y actividad aglutinante en presencia de eritrocitos humanos O.

Determinación del Peso Molecular por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La SDS-PAGE de la lectina purificada se realizó en una unidad electroforética para geles verticales en placa (26) de 10x15 cms (Figura 3). El gel separador contenía 10% de acrilamida, 0.27% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS, 0.03% de TEMED y 0.05% de persulfato de amonio en amortiguador de Tris-HCl 1.5M pH 8.8. El gel espaciador contenía 5% de acrilamida, 0.14% de bis-acrilamida, 0.1% de SDS, 0.05% de TEMED y

0.1% de persulfato de amonio en amortiguador de Tris-HCl 0.5M pH 6.8. Las muestras se disolvieron en el amortiguador de Tris-HCl 0.5M pH 6.8 que contenía SDS al 1%, β -mercaptoetanol al 1%, glicerol al 10% y azul de bromofenol. El corrimiento se llevo a cabo aplicando una corriente de 30 mA por placa durante 4 hrs en un amortiguador de corrimiento Tris 0.05M, glicina 0.04M, SDS al 0.1%, pH 8.4. Posteriormente el gel se fijó con una solución de glutaraldehído al 10% y se lavó 2 veces con 1000 ml de agua destilada durante 30 minutos. Enseguida, se tiñó con una solución de plata amoniacal (Para 100 ml de solución: 1.4 ml de NH_4OH , 21 ml de NaOH al 0.36%, 4ml de AgNO_3 al 19%, aforando al volumen final). Después de lavar con agua destilada durante 2 minutos se cambió el gel a una solución conteniendo 0.005% de ácido cítrico y 0.019% de formaldehído en metanol al 10%. Después de la tinción el gel se lavó durante una hora con agua destilada, cambiándole en tres ocasiones el agua (37).

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO

El isoelectroenfoco de la lectina pura se realizó usando tubos (3mm x 5cm) de electroforésis conteniendo 5% de acrilamida y 0.1% de anfolina, rango 3.5-10 en un aparato Multiphor LKB (Figura 4). Después del enfoque se determinó el gradiente de pH con un electródo de superficie antes del paso del teñido-desteñido, de acuerdo a las especificaciones del fabricante LKB (Bromma, Suecia).

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

El contenido de carbohidratos de la lectina purificada se estimó por medio del método de Dubois (17) con Dextran Mr 10500 como estándar.

ENSAYO DE INMUNOSUPRESION

Los estudios sobre inmunosupresión se realizaron con ratones Balb/c de 25-30 grs. de peso utilizando el esquema reportado por Calderon y Cordoba (12). Inicialmente se aplicaron 0.1 ml de glóbulos rojos de carnero al 2 % en PBS vía intraperitoneal a cada grupo de 3 ratones. A los animales experimentales se les aplicaron 40 μ g de lectina de amaranto también por vía i.p. 4, 3, 2, y 1 día antes de retarlos con el antígeno. Después de 5 días de la estimulación antigénica los animales fueron sangrados, el suero fue separado por ultracentrifugación y se inactivó el complemento por incubación a 56°C durante 1h. Se midió la respuesta humoral de los animales al antígeno por hemaglutinación directa, para esto se utilizaron placas de microtitulación y se empleó la microtécnica de doble dilución seriada, utilizando glóbulos rojos de carnero al 2% en PBS, dejándose incubar 2 hrs a temperatura ambiente antes de efectuar la lectura.

RESULTADOS

PURIFICACION DE LA LECTINA

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* fue purificada a partir de un extracto salino por cromatografía de afinidad en una columna conteniendo fetuina acoplada a Sepharosa 4B, la lectina fue eluida con agua destilada. Por este procedimiento se recuperó 80 % de la actividad aglutinante y aproximadamente el 4.9 % de proteína, la capacidad de retención de lectina que posee la columna utilizada es de 8 mg de proteína. Con este procedimiento se incrementa aproximadamente 16 veces la actividad específica de la fracción purificada en relación con el extracto crudo. (Figura 1), (Tabla 1).

ACTIVIDAD AGLUTINANTE

La actividad aglutinante del extracto salino de la semilla de *A. leucocarpus* así como de las fracciones aisladas en el proceso de purificación fueron determinadas por la microtécnica de doble dilución seriada, los títulos de actividad reportados son la inversa de la última dilución de la lectina con actividad aglutinante visible (observable). Este estudio se realizó en presencia de eritrocitos humanos del sistema ABO y algunos del grupo sanguíneo "O" que poseen además los fenotipos Le^a , Le^b , M, N, MN. Otros ensayos de actividad aglutinante se realizaron con los mismos tipos sanguíneos pero tratados previamente con las enzimas tripsina o neuraminidasa.

CROMATOGRAFIA DE *A. leucocarpus*
EXTRACTO CRUDO SOBRE UNA COLUMNA DE
FETUINA

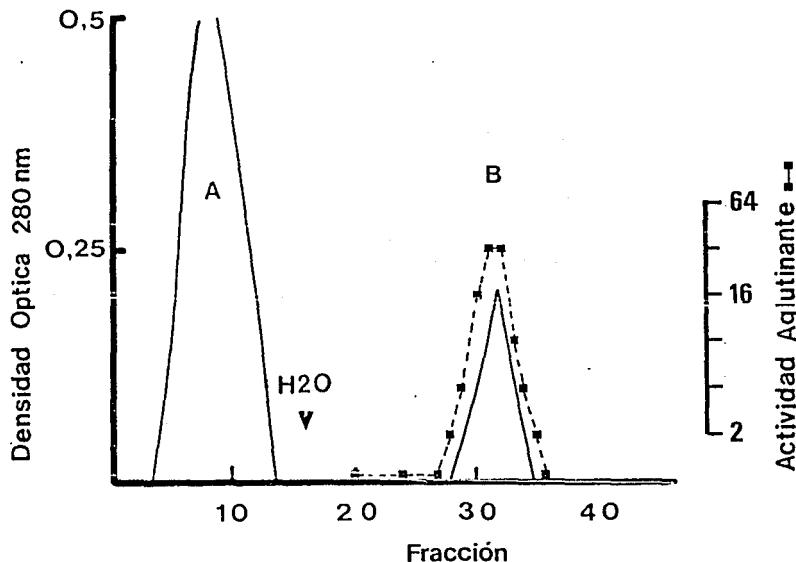


FIGURA 1. Perfil de elución de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* en una columna (10 x 1 cm), conteniendo Fetuina Sepharosa 4B. A las fracciones colectadas (3 ml) se les ajusta la fuerza iónica agregando 0.3 ml de NaCl 1M y se les determina absorbancia a 280 nm (—) y actividad aglutinante (-■-■-■-). Los títulos reportados corresponden al inverso de la última dilución con actividad aglutinante.

TABLA 1. PROCESO DE PURIFICACIÓN DE LA LECTINA DE *A. leuocarpus* POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

FRACCIÓN	PROTEÍNA (mg)	%RENDIMIENTO	UHA	ACTIVIDAD ESPECIFICA UHA/ PROT	FACTOR DE PURIFICACIÓN
EXTRACTO CRUDO	812	100	44,798	55.17	1
FA	503	62	0	0	0
FB	40	4.9	35,838	894.6	16

UHA=TÍTULO/mℓ X VOLÚMEN TOTAL

Como puede apreciarse en la Tabla 2 la lectina de *Amaranthus leucocarpus* aglutina a los distintos tipos de eritrocitos con la misma capacidad, en algunos casos se observan variaciones de más o menos una dilución (ej. eritrocitos "A" en relación con los eritrocitos "O"); sin embargo, en presencia de eritrocitos tratados enzimáticamente con tripsina el título de actividad se incrementa 8 veces, cuando las células rojas fueron previamente tratadas con neuraminidasa la actividad se incremento unas 32 veces. En la misma tabla se puede apreciar que existe mayor actividad hemaglutinante en los eritrocitos del fenotipo M tratados con neuraminidasa o tripsina en relación con el resto de los fenotipos estudiados.

TABLA 2. Actividad aglutinante del extracto crudo de la lectina de *Amaranthus leucocarpus**.

ERITROCITOS	NATIVA	TRIPSINA	NANASA
A1	32	256	1024
A2	32	256	1024
B	32	256	1024
O	64	256	1024
M	32	1024	2048
N	32	256	1024
MN	64	256	1024
Le	32	256	1024
Le	32	256	1024

* Proteína total, 12mg/ml.

ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA

La especificidad de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* fue estudiada mediante la inhibición de la actividad aglutinante con diferentes carbohidratos, oligosacáridos, glicoproteínas y glicopéptidos. Como se aprecia en la Tabla 3 de los diversos carbohidratos estudiados solamente la N-acetil-D-galactosamina (GalNAC) es capaz de inhibir más del 90 % de la actividad aglutinante de la lectina a una concentración de 0.1 M; los demás azúcares simples utilizados, solos o combinados, no ejercen ningún efecto en la actividad manteniéndose los títulos normales aún después de incubar la lectina durante 2 horas con dichos compuestos. Los ensayos de inhibición se realizaron también utilizando glicoproteínas

TABLA 3. Inhibición de la actividad aglutinante de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por 0.1 M de azúcar.

AZUCAR	TITULO
D-galactosa	32
N-acetil-D-galactosamina	2
D-glucosa	32
N-acetil-D-glucosamina	32
L-fucosa	32
D-manosa	32
D-manosamina	32
Ac. N-acetil neuramínico	32
control	32

que poseen estructuras oligosacarídicas conocidas, como se reporta en la Tabla 4; solo la fetuina, la mucina submaxilar bovina y la IgA poseen actividad inhibitoria en concentraciones inferiores a 0.001 mM. La modificación química de algunas glicoproteínas como la desialización de la fetuina o los diversos tratamientos realizados a la mucina estomacal porcina incrementan substancialmente la capacidad inhibitoria de la glicoproteína como en el caso de la asialofetuina y permiten el efecto inhibitorio solamente en el caso de la mucina estomacal porcina tratada con calor y H₂SO₄, Tabla 4.

TABLA 4. Concentración mínima (μ M) de glicoproteínas para inhibir 4 UHA de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*

GLICOPROTEINA	CONCENTRACION
MUCINA A *	N.I.
MUCINA B *	N.I.
MUCINA C *	N.I.
MUCINA D *	0.5
FETUINA	0.0005
FETUINA DESIALIDADA	0.0001
OROSOMUCOIDE	N.I.
Ig A	0.001
Ig G	N.I.
LACTOGLOBULINA	N.I.
MUCINA SUBMAXILAR BOVINA	0.05

* Mucina estomacal porcina: A sin tratar, B tratada con calor, C tratada con H₂SO₄, D tratada con calor y H₂SO₄. El peso molecular de las mucinas se consideró como 1x10⁶ Da. N.I. No inhibidor a 100 μ M.

Glicopéptidos obtenidos de las glicoproteínas inhibitorias mantienen esa actividad aunque se requieren mayores concentraciones para obtener el mismo efecto que las estructuras nativas, Tabla 5.

TABLA 5. Concentración mínima (μM) de glicanos y glicopéptidos necesarios para inhibir 4 UHA de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.

COMPUESTO	CONCENTRACION
Glicano de fetuina *	1.5
Asialoglicanos de fetuina	15
O-glicopéptido de fetuina **	0.1
Asialo-O-glicopéptido de fetuina	0.01
N-glicopéptido de fetuina ***	N.I.
Asialo-N-glicopéptido de fetuina	N.I.
Glicanos de IgA	13
N-glicopéptidos de IgA	N.I.
Glicano I de Mucina ****	15
Glicano II de Mucina	12
Glicano III de Mucina	N.I.
Glicano de eritocitos humanos	17
N-glicopéptido de eritrocitos A	N.I.

* El glicano está compuesto por NeuAc α 2,3gal β 1,3galNac.

** En el glicopéptido de fetuina el glicano está unido al péptido a través de una serina o treonina.

*** La estructura básica de los N-glicopéptidos contiene 3 manosas, 4 N-acetil-D-glucosamina y se encuentran unidos a un residuo de asparagina.

**** Los glicanos I, II y III pertenecen a la mucina estomacal porcina.

PESO MOLECULAR

El peso molecular de la lectina pura en condiciones no desnaturalizantes determinado por cromatografía de filtración es de 70 000 Da (Figura 2) y por electroforesis en SDS es de 35 000 Da (Figura 3). Como se aprecia en la Figura 2 la elución de la lectina en el gel cromatográfico se obtiene en dos fracciones, de las cuales solo la fracción que corresponde a 70 000 Da presenta actividad; considerándose que la fracción eluída en el volúmen de exclusión que corresponde a un peso superior a 100 000 Da está formada por agregados moleculares de la propia lectina. Estudios posteriores indican que la lectina en estado puro posee una gran tendencia a formar tales agregados inactivos (datos no mostrados).

PUNTO ISOELECTRICO Y CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* es una glicoproteína que contiene el 10 % de azúcares por peso. El punto isoeléctrico corresponde a varios componentes focalizados entre el pH 4.8 y 5.2 (Figura 4), (Tabla 6)

TABLA 6. Caracterización química de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.

Glicoproteína	10% de carbohidratos en peso
Peso molecular (Nativa)	70KDa
Peso molecular (SDS-PAGE)	35KDa
pI	4.8-5.2

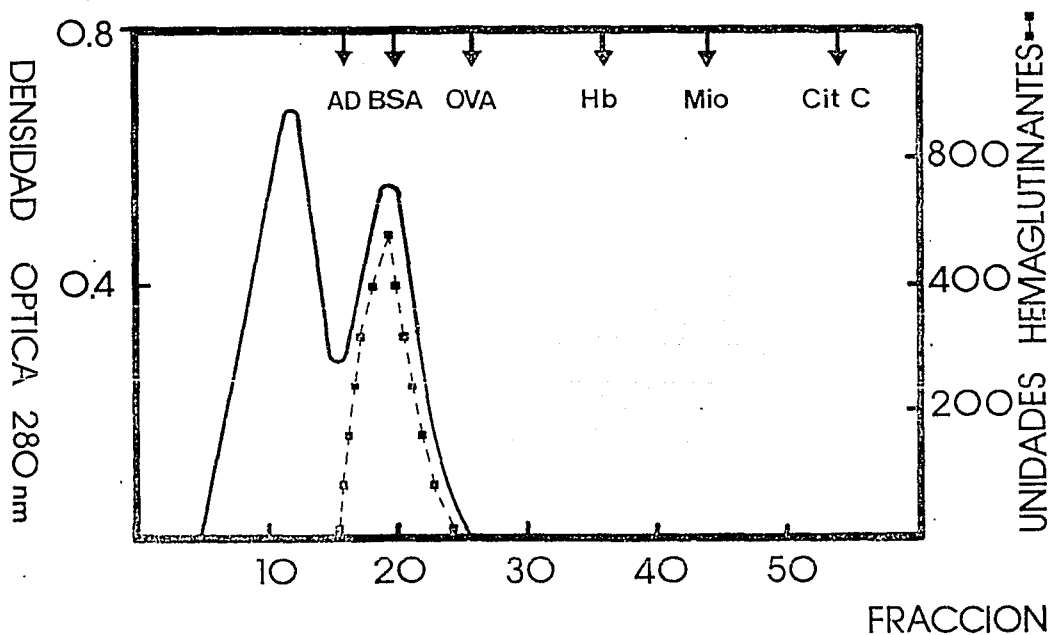


FIGURA 2. Perfil de elución de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por cromatografía de filtración en una columna (100 cm x 1.2) de Sephadex G-100. A las fracciones colectadas se les determinó absorbancia (—) y actividad aglutinante (-■-■-■-). Los títulos reportados corresponden al inverso de la última dilución con actividad aglutinante.

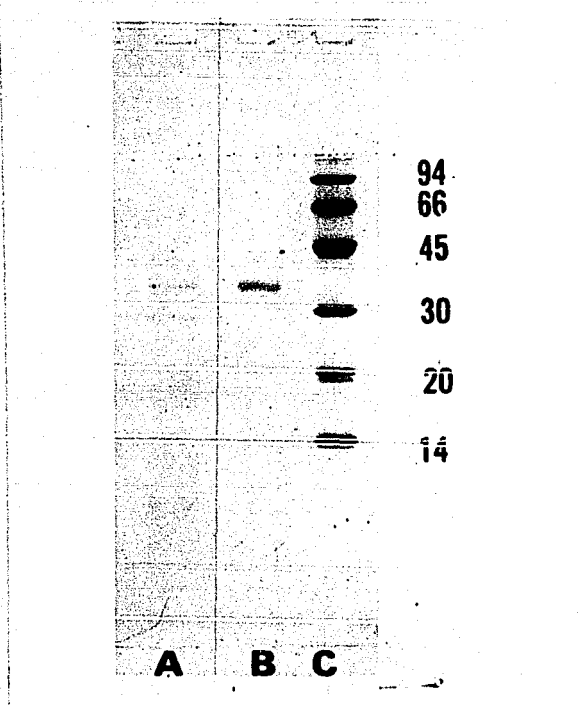


FIGURA 3. Determinación del peso molecular de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por PAGE-SDS. El peso molecular de las subunidades de la lectina fue determinado comparando su factor de migración (Rf) con el de proteínas conocidas. Carril (A) 25 μg de extracto crudo; (B) 10 μg de lectina purificada; (C) marcadores de peso molecular conocidos (LKB).

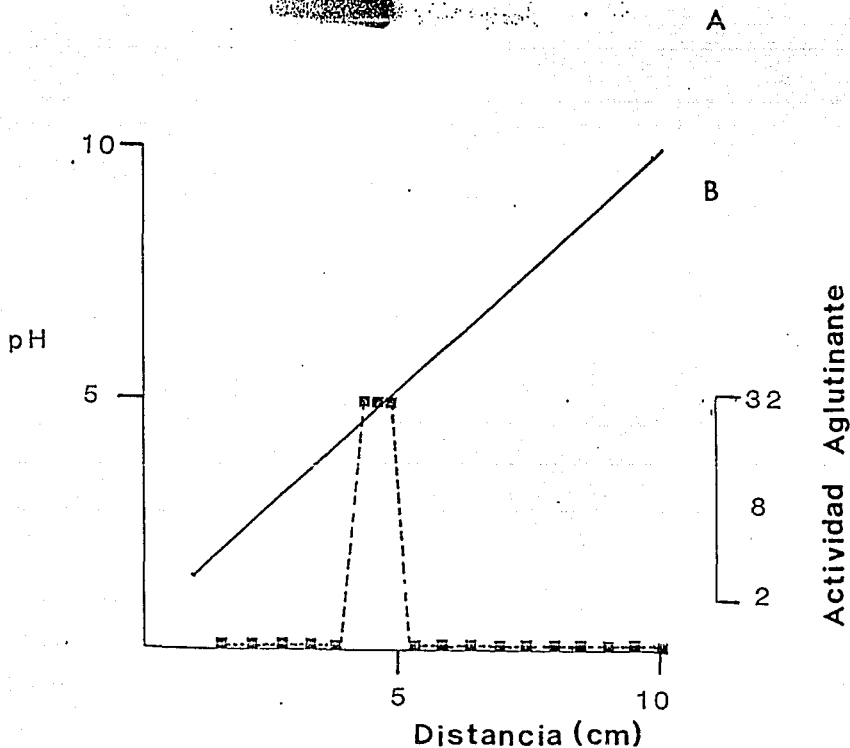


FIGURA 4. Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por electroenfoque utilizando un gel al 5% de acrilamida conteniendo 0.1% de anfolinas (pH 3.5-10). El pH del gel se determinó con un electródo de superficie. Posteriormente el gel fue teñido con azul de coomasie. (A) Isofocalización de la lectina en presencia de urea 4M. (B) Gráfica del gradiente de pH en condiciones no desnaturizantes; se muestra la actividad aglutinante de cada fracción para eritrocitos del grupo A (-■-■-■-).

INMUNOSUPRESION

La evaluación sobre el efecto inmunosupresor de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* se llevó a cabo aplicando 40 μ g de la lectina en 0.1 ml de PBS vía i.p. a los ratones de la cepa Balb/c 4, 3, 2 y 1 día antes de retarlos con 0.1 ml de GRC al 2 % en PBS y midiendo la producción de anticuerpos contra este antígeno después de 5 días de su aplicación. Los resultados se muestran en la Tabla 7 y como se observa la lectina de *A. leucocarpus* suprime significativamente la respuesta humoral cuando es aplicada 2 o un día antes de la estimulación antigénica. Por el contrario, la lectina no tiene ningún efecto supresor sobre la producción de anticuerpos cuando es aplicada 4 días antes, un día después o el mismo día que la inyección del antígeno, y la respuesta que se presenta en los animales a los que se les aplicó la lectina 3 días antes que el antígeno representa solo un 25 % de la observada en los animales control.

TABLA 7. Actividad inmunosupresora de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*. Efecto de el tiempo de administración.

DIA DE LA APLICACION	TITULO ANTI-GRC
-4	128
-3	32
-2	2
-1	2
0	64
1	128
control	128

La concentración de la lectina administrada fue de 40 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$.
La dosis óptima fue determinada en experimentos previos.

DISCUSION

La relevancia del proceso de purificación de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* es, en primer lugar, el alto rendimiento de actividad, en segundo, la especificidad, ya que se obtiene un factor de purificación de 16 con respecto al extracto crudo; y el tercer aspecto importante es el bajo costo ya que se utiliza agua destilada. El hecho de eluir cuantitativamente con agua destilada indica en principio que se está induciendo un estado de desnaturalización reversible (pues se recupera la actividad simplemente restituyendo la fuerza iónica con SSI). Las razones por las cuales podemos purificar a la lectina de la columna de afinidad adicionando agua podrían ser: a) que se modifica la estructura tridimensional, b) que cerca del sitio activo de la lectina se encuentran porciones hidrofóbicas y c) que el mismo sitio activo de la lectina está compuesto por residuos hidrofóbicos. Estas observaciones también han sido reportadas para otras lectinas como la Con A (20, 47, 60) y la del frijol de lima (20) entre otras (38, 39).

En el ensayo de cromatografía de filtración de la lectina purificada se observó que en estado nativo la lectina tiende a agregarse, como se muestra en el perfil de elución de la Figura 2, este proceso guarda una relación estrecha con el tiempo de almacenamiento, pues al aumentar éste la lectina tiende a formar agregados moleculares hasta que pierde su actividad aglutinante (datos no mostrados). La fracción activa se eluyó en un volumen de exclusión que corresponde a los 70 000 Da por lo cual se consideró que este es el peso molecular de la lectina de *A. leucocarpus*. De

acuerdo a la Figura 3, la lectina analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS muestra una banda con un peso molecular de 35 000 Da, lo cual sugiere que la lectina está formada por dos unidades monoméricas iguales.

La lectina de *Amaranthus leucocarpus* purificada mediante este método es una glicoproteína que contiene 10% de azúcares por peso.

En cuanto a la actividad aglutinante que la lectina de *Amaranthus leucocarpus* posee hacia las células rojas humanas se observa que no es específica para ningún grupo sanguíneo humano del sistema ABO, ya que reconoce con la misma capacidad a los distintos grupos estudiados; sin embargo en presencia de eritrocitos con el fenotipo M se observa un ligero incremento en el título de aglutinación después de que las células han sido tratadas enzimáticamente. Es importante indicar que en apariencia las estructuras sacarídicas reconocidas por la lectina no tienen ninguna relación con los determinantes de grupo sanguíneo ABO (34), esto sugiere que la lectina está interactuando con estructuras sacarídicas que no forman parte de tales determinantes y sí con algunas otras glicoproteínas estructurales de la membrana como podría ser la glicoforina (25, 62) y/o el determinante de fenotipo M (62).

La modificación enzimática de las células con tripsina y neuraminidasa incrementa el título aglutinante de la lectina; este fenómeno ha sido observado con diversas lectinas. En el primer caso se ha planteado un desenmascaramiento de estructuras glicosídicas ocultas bajo la capa proteica de la membrana y en el segundo caso la exposición de los residuos de galactosa por la liberación del ácido

siálico (20). El caso típico de este proceso es el de la lectina de cacahuate, PNA (*Arachis hypogaea*) que reconoce específicamente a los residuos de galactosa (20); aún más, la interferencia provocada por el ácido siálico en el reconocimiento de esta lectina se observa en el fenómeno de aglutinación, ya que los eritrocitos nativos no son aglutinados del todo y en cambio las células que han sido tratadas con esta enzima son reconocidas y aglutinadas.

En nuestro caso, la presencia de ácido siálico modifica la capacidad de reconocimiento, sin embargo, no impide la aglutinación, esto nos confirma en cierta forma que la interacción de la lectina se efectúa con estructuras cercanas a la superficie celular.

La especificidad de la lectina ha sido analizada por diversos métodos, algunos utilizan la precipitación cuantitativa de la proteína en presencia de su ligando (58) o bien la inhibición de la precipitación con diversos azúcares (48, 58,) también se ha utilizado la cromatografía de afinidad acoplando diversas estructuras sacarídicas conocidas, o bien la lectina inmovilizada y adicionándole estructuras conocidas (35). En este trabajo utilizamos la técnica de inhibición de la actividad aglutinante (35); por este procedimiento identificamos que solo el azúcar GalNAc es capaz de inhibir la actividad aglutinante. El hecho de que esta lectina no reconoce ningún determinante de grupo sanguíneo (específicamente al del grupo A) nos permitió suponer que la especificidad de la lectina requiere de otras secuencias o estructuras para su interacción con la superficie celular, por esta razón decidimos utilizar estructuras conocidas más complejas.

De las estructuras utilizadas solamente la fetuina, la mucina submaxilar bovina y la IgA poseen actividad inhibitoria sobre la actividad de la lectina; la mucina estomacal porcina también posee actividad inhibitoria, pero solo después de haber sido tratada químicamente. Los dos tipos de mucina se caracterizan por poseer únicamente enlaces o-glicosídicos, en cambio cada molécula de fetuina posee solo tres residuos o-glicosídicos y 14 N-glicosídicos (8), de manera semejante la IgA posee ambos tipos de estructuras glicosídicas. Los enlaces o-glicosídicos se caracterizan por poseer como estructura de base a la GalNAc unida a la porción peptídica, en tanto que los N-glicosídicos poseen a la GlcNAc unida a la asparagina.

El hecho de que la mucina estomacal porcina requiera de modificación química para el reconocimiento de la lectina se debe posiblemente a la complejidad estructural y a que solamente la hidrólisis efectuada hace accesible la interacción con la lectina.

Estos resultados nos permiten proponer a la lectina de *Amaranthus leucocarpus* como específica para estructuras o-glicosídicas que contienen NeuAc α 2,3gal β 1,3galNAc (glicanos de fetuina, IgA, glicoforina) y NeuAc α 2,6galNAc (mucina submaxilar bovina).

Resultados semejantes se han obtenido con las lectinas aisladas del mismo género (48).

La lectina de *A. leucocarpus* presenta actividad supresión de la respuesta inmune murina contra un antígeno T-dependiente, glóbulos rojos de carnero, cuando es aplicada de 72 a 24 hrs. antes de la

aplicación del antígeno y tiene su mayor efecto supresor a las 48 horas antes de la estimulación antigénica. Este efecto es entonces dependiente de la concentración y del tiempo de administración de la lectina con respecto al antígeno, y además es reversible. Este tipo de supresión de la respuesta inmune humoral puede ser explicada a varios niveles. La lectina de *Amaranthus. leucocarpus* puede estar impidiendo -por medio de su interacción con la membrana del macrófago- la fagocitosis del antígeno. También podría actuar bloqueando la presentación antigénica por parte del macrófago, o bien inhibiendo la síntesis y secreción de factores solubles necesarios para montar una buena respuesta primaria. Para dilucidar a que nivel actúa esta lectina será necesario estudiar su efecto sobre la actividad fagocítica del macrófago.

CONCLUSIONES

Se ha planteado un procedimiento de purificación sencillo y con buen rendimiento para la lectina de *Amaranthus leucocarpus*, ya que incrementa su actividad específica.

Se ha identificado la especificidad de la lectina por residuos GalNAc y principalmente por residuos Gal β 1,3galNAc.

Se presenta a la lectina de *A. leucocarpus* como un reactivo para el aislamiento de glicoproteínas o células que contienen el residuo Gal β 1,3galNAc.

Se tendrá que evaluar más profundamente la posibilidad de que esta lectina sea utilizada como reactivo analítico para grupos sanguíneos M.

La lectina de *A. leucocarpus* es un agente inmunosupresor aunque se desconoce su mecanismo.

BIBLIOGRAFIA

1. Alejandro I.G. Cultivo del Amaranto en México. Universidad de Chapingo. Departamento de Zonas Aridas. Dirección de Difusión Cultural. 1986 México, D.F. 245 pp.
2. Aub J.C., Tieslau C. and Lankester A. Reactions of Normal and Tumor Cell Surfaces to Enzymes, I. Wheat Germ Lipase and Associated Mucopolysaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1963 50:613-619.
3. Aub J.C., Sanford B.H. and Cote M.N. Studies on Reactivity of Tumor and Normal Cells to a Wheat Germ Agglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1965 54:396-399.
4. Aub J.C., Sanford B.H. and Wong Li-Hsia. Reactions of Normal and Leukemic Cell Surfaces to a Wheat Germ Agglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1965 54:400-402.
5. Barondes S.H. Lectins: Their Multiple Endogenous Cellular Functions. Ann. Rev. Biochem. 1981 50:207-231.
6. Barondes S.H. Soluble Lectins: A New Class of Extracellular Proteins. Science 1984 223(4640):1259-1264.
7. Barondes S.H. Bifunctional Properties of Lectins: lectins redefined. TIBS 1988 13(12):480-482.
8. Berman E. Reinvestigation of the Carbohydrate Chains of Calf Fetuin Using ^{13}C -N.M.R. Spectroscopy. Carbohydr. Res. 1986 152:33-46.
9. Bourges H. Perfil Bromatológico del Amaranto. En: Memoria del Primer Seminario Nacional del Amaranto. Compiladores: Santos A.T., Gómez F. y Suárez G. Chapingo, México. 1986. 577 pp.

10. Bowles D.J. Lectins as Membrane Components: Implications of Lectin Receptor Interaction. FEBS Lett. 1979 102(1):1-3.
11. Boyd W.C. and Shapleigh E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (lectins). Science 1954 119:419.
12. Calderon R.A. and Cordoba F. Immunosuppressive activity of Phaseolus coccineus and Phaseolus vulgaris extracts in mice. Eur. J. Immunol. 1976 6:522-525.
13. Calderon de la Barca A.M., Ochoa J.L. and Valencia M.E. Effect of the Extraction of a Hemagglutinin on the Nutritive value of *Amaranthus leucocarpus* seeds. J. Food Sci. 1985 50:1700-1702.
14. Calderon de la Barca A.M., Zenteno E., Ochoa J.L., Valencia M. and Carvajal R. The Removal of *Amaranthus leucocarpus* lectin affects the Nutritional value of the Seed Meal. En: Lectins Vol IV. Editors: T.C Bog-Hansen, J. Breborowicz. Walter de Gruyter & Co., Berlin- New York. 1985 pags. 531-536.
15. Calderon de la Barca A.M., and Vázquez-Moreno L. *Amaranthus cruentus* Lectin: Purification, Stability, and Some Biochemical Properties. J. Food Biochem. 1988 12:117-126.
16. Casillas F.J. Importancia de la Semilla de la Alegría. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Compiladores: Santos A.T., Gómez F. y Suárez G. Chapingo, México. 1986. 577 pp.
17. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton P.A., Rebers P.A. and Smith F. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956 28(3):350-356.
18. Gallily R., Vray B., Stain I. and Sharon N. Wheat Germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. Immunology 1984 52:679-686.

19. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T. and Sharon N. What should be called a lectin? *Nature* 1980 285:66.
20. Goldstein I.J. and Poretz R.D. Isolation, Physicochemical Characterization, and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins. En: *The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.* Cap 2. Edited by Lierner I.E., Sharon N., Goldstein I.J. Academic Press Inc. 1986. Orlando, Florida, USA.
21. Harrison F.L. and Chesterton C.J. Factors Mediating Cell-Cell Recognition and Adhesion. *FEBS Lett.* 1980 122(2):157-165.
22. Inbar M. and Sachs L. Interaction of the Carbohydrate-Binding Protein Concanavalin A with Normal and Transformed Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1969 63:1418-1425.
23. Kauffman Ch. S. Observaciones sobre las investigaciones preliminares para el desarrollo de variedades mejoradas de Amaranto de grano en cinco países. En: *Primer Seminario Nacional del Amaranto.* Compiladores: Santos A.T., Gómez F. y Suárez G. Chapingo, México. 1986 577 pp.
24. Koeppe S.J. and Rupnow J.H. Purification and Characterization of a Lectin from the seeds of Amaranth (*Amaranthus cruentus*). *J. Food Sci.* 1988 53(5):1412-1422.
25. Krotkiewski H. The Structure of Glycophorins of Animal Erythrocytes. *Glycoconjugate J.* 1988 5:35-48.
26. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:680-685.
27. Lis H. and Sharon N. The Biochemistry of plants lectins (Phytohemagglutinins). *Ann. Rev: Biochem.* 1973 42:541-574.

28. Lis H. and Sharon N. Lectins: Their Chemistry and Application to Immunology. En The Antigens Vol.IV Cap.7. Sela Academic Press. 1978 pags. 429-459.
29. Lis H. and Sharon N. Lectins as Molecules and as Tools. Ann. Rev. Biochem. 1986 55:35-67.
30. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randal R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951 193:265-275.
31. Lutz R. Observaciones sobre el cultivo y uso de los amarantos en América Latina. En: Primer Seminario Nacional del Amaranto. Compiladores: Santos A.T., Gómez F. y Suárez G. Chapingo, México. 1986 577 pp.
32. Maldonado M.G. Reconocimiento Intercelular: factores involucrados en el reconocimiento por macrofagos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias UNAM 1985 61pp.
33. Marx J.L. Amaranth: a comeback for the Food of the Aztecs? Science 1977 198(4312):40.
34. Monsigny M. Evidencing of Blood Groups Antigens by Lectins. Information Bulletin of Lectins 1977 1(1). Industrie Biologique Francaise IBF.
35. Montreuil J., Debray H., Debeire P. and Delannoy P. Lectin as oligosaccharide receptors. En: Structural Carbohydrates in the Liver. MTP Press Limited. Editores: Popper H., Reutter W., Köttgen E. and Gudat F. Boston. 1982 Cap. 22:239-258.
36. Nowel P.C. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leucocytes. Cancer Res. 1960 20:462-466.

37. Oakley B.R., Kirsch D.R. and Morris N.R. A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. 1980 105:361-363.
38. Ochoa J.L. and Kristiansen T. Stroma: as an Affinity Adsorbent for non-inhibitable Lectins. FEBS Lett. 1978 9(1):145-148.
39. Ochoa J.L. and Kristiansen T. Purification and Partial Characterization of an agglutinin from *Phaseolus coccineus* var. "alubia". Biochim. Biophys. Acta 1982 705:396-404.
40. Ochoa J.L., Calderon de la Barca A.M., Zenteno E. y Montaña C. Investigaciones sobre el Amaranto en el CIB. CIB Boletín 2a etapa 1982 No. 11:1-3.
41. Ofek I., Mirelman D. and Sharon N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. Nature (London) 1977 265:623-625.
42. Ofek I., Beachey E.H. and Sharon N. Surface Sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. TIBS 1978 3:159-160.
43. Ofek I. and Sharon N. Lectinophagocytosis. A Molecular Mechanism of Recognition between Cell Surface Sugars and Lectins in the Phagocytosis in Bacteria. Minireview. Infec. Immunity 1988 56(3):539-547.
44. Ortiz de Montellano B.R. Aztec Cannibalism: An Ecological Necessity? Science 1978 200(4342):611-617.
45. Pardoe G.I., Bird G.W.G., Uhlenbruck G., Sprenger I. and Heggen M. Heterophile agglutinins with a broad-spectrum specificity. VI. The nature of cell surface receptors for the agglutinins present

- in seeds of *Amaranthus caudatus*, *Maclura aurantica*, *Datura stramonium*, *Viscum album*, *Phaseolus vulgaris* and *Moluccella laevis*. Immunotaestforsch. Allerg. Klin. Immunol. 1970 140:374-394.
46. Rauvala H. Cell Surface Carbohydrates and Cell Adhesion TIBS 1983 8:323-325.
47. Reeke G.N. Jr., Becker J.W., Cunningham B.A., Gunther G.R., Wang J.L. and Edelman G.M Relationships Between the Structure and Activities of Concanavalina A. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1974 234:369-382.
48. Rinderle S.J., Goldstein I.J., Matta K.L. and Ratcliffe R.M. Isolation and Characterization of Amaranthin, a Lectin Present in the Seeds of *Amaranthus caudatus*, that Recognizes the T- (or Cryptic T)-Antigen. J. Biol. Chem. 1989 264(27):16123-16131.
49. Rinderle S. J., Goldstein I.J. and Remsen E. E. Physicochemical Properties of Amaranthin, the Lectin from *Amaranthus caudatus* Seeds. Biochemistry 1990 29:10555-10561.
50. Sanchez-Marroquín A. Potencialidad Industrial del Amaranto. CEESTEM. México, D.F. México 1988.
51. Sata T., Zuber C., Rinderle S.J., Goldstein I.J. and Roth J. Expression Patterns of the T Antigen and the Cryptic T Antigen in Rat Fetuses: Detection with the Lectin Amaranthin. J. Histochem. Cytochem. 1990 38(6):763-774.
52. Sela B., Lis H., Sharon N. and Sachs L. Different Locations of Carbohydrate-Containing Sites in the Surface Membrane of Normal and Transformed Mammalian Cells. J. Membrane Biol. 1970 3:267-279.
53. Sharon N. and Lis H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. Science 1972 177(4053):949-959.

54. Sharon N. Lectins. *Sci. Amer.* 1977 236(6):108-119.
55. Sharon N. Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol. Today* 1984 5(5):1-5.
56. Sharon N. and Lis H. A century of Lectin Research. *TIBS* 1987 12(12):488-491.
57. Sharon N. and Lis H. Lectins as Cell Recognition Molecules. *Science* 1989 246:227-234.
58. So L.L. and Goldstein I.J. Protein-Carbohydrate Interaction. IV. Application of the Quantitative Precipitin Method to Polysaccharide-Concanavalin A Interaction. *J. Biol. Chem.* 1967 242(7):1617-1622.
59. Stockert R.J., Morell A.G., and Scheinberg I.H. Mammalian Hepatic Lectin. *Science* 1974 186(4161):365-366.
60. Strosberg A.D., Buffard D., Lauwereys M. and Fouriers A. Legume Lectins: A Large Family of Homologous Proteins. En: *The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine.* Cap. 3. Editado por Lierner I.E., Sharon N. Goldstein I.J. Academic Press Inc. 1986. Orlando, Florida, USA.
61. Teodorescu M. and Mayer E.P. Binding of Bacteria to Lymphocyte Subpopulations. *Adv. Immunology* 1982 33:307-351.
62. Tomita M., Futhmayr H. and Marchesi V.T. Primary Structure of Human Erythrocyte Glycophorin A. Isolation and characterization of Peptides and Complete Amino Acid Sequence. *Biochemistry* 1978 17:4756-4770.