

El presente trabajo se realizó conjuntamente en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM y en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, bajo la asesoría de los Dres. Edgar Zenteno Galindo y Rocio Coutiño Rodríguez. Este trabajo recibió apoyo de CONACYT(1595 y 2151 PM) y DGAPA-UNAM (PAPIIT-21396).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

260450



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A MIS PADRES

PEDRO Y JULIA.

Con cariño, como una muestra de agradecimiento por todos estos años de lucha, por haber reído y llorado conmigo y por perdonar mis errores.

A MIS HERMANAS

SAYRALIZ, VIOLETA Y ANA.

Gracias por su apoyo y comprensión.

A EDGAR

Por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo.

A GLORIA

Gracias por todos los bellos momentos que hemos pasado juntos y por ayudarme a encontrar la serenidad cuando más lo necesitaba. TQM.

A TODOS LOS CUATES!!!!

Agradezco profundamente a todos los cuates del laboratorio nueve por soportar mis berrinches y por hacer más agradables las horas de trabajo; ya saben como nuestro labo no hay dos en el mundo, gracias al Dr. Chávez y a Patricia Rollocica por aceptarme en su equipo de bromas como un colaborador más, a Richardito por todas las chocoaventuras que nos has contado, especialmente a Flowercita, por ser mi vecina y sobre todo por soportar mis enojos, a mi hermano Jesús y a mi cuñada Olivia por ser buena onda; a Gina por enseñarnos las técnicas más modernas para coagularse discretamente, a Julito y Blanca por ser unos pipopes buena onda. A Robert, por ser tan despistado.

Especialmente y con cariño a MAMA CONCH, por ser tan buena onda conmigo y por que en varias ocasiones se porta como una verdadera MAMA, aunque siempre me ande desconociendo.

Para los cuates nuevos: Blanca II, Maricarmen y Yonathan, quienes rápidamente se adaptan a nuestra curiosa forma de ver y hacer el trabajo en el labo.

Agradezco especialmente a Araceli Zavala, por el apoyo técnico en la realización de este trabajo.

Y a todos mis amigos que siempre me han apoyado: Imelda, Carlos, Herlinda, Carolina, Leonardo, Pepe, Erick, Billy, Cesy y Xochilt

INDICE.

RESUMEN.	1.
INTRODUCCIÓN.	4.
GENERALIDADES.	5.
Historia.	5.
Especificidad por carbohidratos.	6.
Estructura.	10.
El amaranto.	11.
OBJETIVOS.	15.
METAS.	15.
MATERIAL Y METODOS.	16.
MATERIALES.	16.
EXTRACCION DE LA LECTINA.	16.
PURIFICACION DE LA LECTINA.	17.
Purificación de la lectina con estromas de eritrocitos humanos.	17.
Purificación de la lectina con fetuína e inmunoglobulina A acopladas a sepharose	17.
CARACTERIZACION QUIMICA.	20.
Determinación de proteína.	20.
Determinación del peso molecular por SDS-PAGE.	20.
Composición de aminoácidos.	21.
Determinación del amino terminal.	21.
Obtención de glicopéptidos de la lectina.	22.

Composición de carbohidratos.	23.
MODIFICACION QUIMICA DE LA LECTINA.	23.
Succinilación	23.
Carboximetilación	24.
Oxidación con metaperiodato.	24.
Deglicosilación.	24.
PURIFICACION DE ISOFORMAS DE LA LECTINA.	25.
ESPECTRO DE DICROISMO CIRCULAR.	26.
ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA.	27.
Actividad hemaglutinante.	27.
Tratamiento de los eritrocitos mediante enzimas	27.
Inhibición de la actividad hemaglutinante con carbohidratos.	28.
Inhibición de la actividad hemaglutinante con glicoproteínas, glicopéptidos y glicanos.	28.
Efecto del pH en la interacción de la lectina sobre con su receptor.	29.
RESULTADOS.	30.
DISCUSION.	51.
CONCLUSIONES.	58.
PERSPECTIVAS.	59.
BIBLIOGRAFIA.	60.

ABREVIATURAS.

kDa.	Kilodaltons.
Con A.	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> .
LCA.	Lectina de <i>Lens culinaris</i> .
CRD.	Domino de reconocimiento a carbohidrato.
SSI.	Solución salina isotónica.
Gal.	Galactosa.
GalNac.	N-acetilgalactosamina.
Glc.	Glucosa.
GlcNac.	N-acetilglucosamina.
Man.	Manosa.
Fuc.	Fucosa.
Xil.	Xilosa.
IgA.	Inmunoglobulina A
UHA.	Unidades hemaglutinantes.
Kell.	Antígeno de grupo sanguíneo.
Le ^a	Antígeno Lewis a
Le ^b	Antígeno Lewis b.
M	Antígeno M de la glicoforina A.
N	Antígeno N de la glicoforina A.
P	Antígeno de grupo sanguíneo
S	Antígeno de grupo sanguíneo

RESUMEN

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que reconocen estructuras sacarídicas específicas y son herramientas útiles en el aislamiento y caracterización de glicoproteínas y componentes en membranas celulares. En este trabajo reportamos la purificación y caracterización de la lectina de la semilla de *Amaranthus leucocarpus*, así como su especificidad por estructuras oligosacarídicas complejas. La lectina se purificó por cromatografía de afinidad utilizando estroma de eritrocitos humanos inmovilizados en Sephadex G-25. La lectina es un homodímero de 35 kDa, con un pI de 4.8-5.4. Esta lectina es una glicoproteína que contiene el 10% de carbohidratos. La porción glicosídica posee estructuras oligomanosídicas principalmente y en la porción proteica contiene 21.6% de aminoácidos cargados negativamente (aspártico y glutámico), 43.2% no polares (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina y prolina), el 8.3% de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), 4.6% de aminoácidos cargados positivamente (histidina y arginina) y 0.9% de residuos de cisteínas por subunidad. Mediante la degradación de Edman se encontró que el amino terminal de la lectina está bloqueado. Estudios de dicroísmo circular en la región lejana del ultravioleta nos permiten identificar que la lectina está formada por 60% de hojas plegadas beta en su estructura secundaria. La porción glicosídica participa aparentemente en la conformación tridimensional de la lectina, debido a que el tratamiento enzimático con Endo F y el tratamiento con periodato reducen de manera importante la actividad hemaglutinante de la lectina.

La lectina de *A. leucocarpus* aglutina a eritrocitos humanos del sistema A, B y O. Esta actividad se incrementa significativamente con eritrocitos del fenotipo M, tratados previamente con neuraminidasa o pronasa, estos tratamientos eliminan la resistencia polar

entre los grupos celulares y exponen a los receptores específicos para la lectina, lo que sugiere que existe una organización estructural importante del receptor glicosilado en la membrana del eritrocito. La especificidad por carbohidratos se determinó con ensayos de inhibición de la actividad hemaglutinante con carbohidratos y glicoproteínas. La lectina es específica por N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y el disacárido Gal β 1-3GalNAc Ser/Thr. Nuestros resultados indican que la lectina interactúa principalmente con el hidróxilo axial del C4 y el grupo acetilo en posición ecuatorial del C2 de la GalNAc. Nuestros resultados establecen, por primera vez, las características fisicoquímicas y de especificidad de una lectina perteneciente al grupo de los pseudocereales.

INTRODUCCION

Las lectinas son 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 y no poseen actividad enzimática¹. Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han identificado en diversos organismos desde virus, bacterias, hongos hasta plantas y en vertebrados superiores. Las lectinas aisladas del reino vegetal han sido ampliamente estudiadas y presentan actividades biológicas diversas como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies¹, la estimulación mitogénica de linfocitos², inhibición de la fagocitosis^{3,4}, también presentan efectos inmunosupresores y algunas lectinas pueden ser tóxicas, inhibir el crecimiento de células tumorales y participar en la adhesión celular⁴. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor de carácter oligosacarídico³⁻⁸.

En vegetales, principalmente en las leguminosas, se ha demostrado la participación de las lectinas en la simbiosis que existe entre especies de la familia de las leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno^{9,10} y se ha visto que un género de bacteria es capaz de infectar a una especie de planta sin tener capacidad infectante en otras plantas incluso del mismo género; así, las bacterias que infectan al frijol no son las mismas que infectan a la soya o al trébol. En animales se han encontrado evidencias de que las lectinas participan en fenómenos tales como el reconocimiento y la eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio^{5,9,11}, así como de células envejecidas, tumorales^{6,13} y microorganismos^{6,8,13}; con la participación de células con actividad fagocítica^{12,13}. Las lectinas participan en diversos procesos de reconocimiento que

permiten la diferenciación celular¹⁴, la organogénesis,¹⁴ la migración de linfocitos^{5,6} y se ha demostrado que son factores determinantes en la metástasis de diversos tumores^{5,6}.

En la actualidad, existen suficientes evidencias para afirmar que en efecto, a nivel evolutivo, existen lectinas que tienen un papel fundamental en el reconocimiento celular, y una participación importante en la complicada red de defensa contra infecciones^{3,4}. Las lectinas han demostrado ser herramientas útiles en la investigación biomédica, en donde se les utiliza para la tipificación de grupos sanguíneos y bacterianos, hasta como auxiliares en el trasplante de médula ósea de pacientes con inmunodeficiencias severas^{5,15}. La actividad mitogénica de algunas lectinas ha sido muy importante para el análisis de los eventos bioquímicos que se desarrollan durante la estimulación de los linfocitos *in vivo* y son aplicadas en la valoración de la actividad celular de diferentes enfermedades infecciosas. Las lectinas también han sido empleadas en la separación de poblaciones celulares¹⁶. En forma inmovilizada, las lectinas son utilizadas para purificar macromoléculas que contienen carbohidratos, por ejemplo glicoproteínas, enzimas, hormonas y diversos componentes de membranas.

La gran variedad de actividades biológicas que presentan las lectinas, se debe a su capacidad de interactuar con oligosacáridos en una determinada conformación y secuencia. Se ha observado que a pesar de la gran similitud estructural que existe entre lectinas de una familia, sus actividades biológicas son diversas, lo que ha llevado a que aumenten los estudios sobre las bases moleculares de la interacción carbohidrato-lectina.

GENERALIDADES

HISTORIA

Las lectinas fueron identificadas en 1888 por H. Stilmark; cuando estudiaba la toxicidad de la semilla de higuera (*Ricinus communis*), él observó que los extractos de estas semillas aglutinaban eritrocitos. Posteriormente el alemán Paul Ehrlich, indujo en ratones resistencia al efecto tóxico de *R. comunis*, mediante la formación de anticuerpos que neutralizaban a la proteína. A partir del descubrimiento de la ricina se estudiaron diversos extractos vegetales, que también mostraron capacidad para aglutinar eritrocitos. En 1908 K. Landsteiner y H. Rubitchek, observaron que los extractos de algunas semillas variaban en su actividad aglutinante hacia eritrocitos de diversas especies de animales; así, el extracto de chícharo (*Pisum sativum*) aglutina mejor a los eritrocitos de carnero, mientras que los eritrocitos humanos son aglutinados preferentemente por los extractos de frijol (*Phaseolus vulgaris*)¹².

En 1919 Summer purificó la lectina de haba blanca *Canavalia ensiformis* (Con A) y en 1935, junto con Howell, descubrió que la lectina aglutina eritrocitos, bacterias, levaduras y tiene la capacidad de precipitar glicógeno en solución; además, demostraron que la capacidad aglutinante de la Con A era inhibida con el azúcar de caña y sugirieron que el efecto aglutinante se debía a la relación entre la proteína de la planta con los carbohidratos de la superficie de los eritrocitos¹⁷.

En 1948 Boyd y Renkonen, descubrieron, independientemente que ciertos extractos crudos de plantas aglutinaban específicamente a ciertos fenotipos de los grupos sanguíneos; así, el extracto crudo de frijol de lima (*Phaseolus limensis*) aglutinaba eritrocitos humanos del grupo A, mientras que extractos obtenidos de espárrago

aglutinaban a los eritrocitos del grupo O.

En 1952 Watkins y Morgan, identificaron que existía una correlación entre la actividad aglutinante de ciertas lectinas y la capacidad de inhibir de manera específica con carbohidratos, las actividades aglutinantes. Concluyeron entonces que los carbohidratos pueden ser las moléculas determinantes en los grupos sanguíneos humanos, de esa manera identificaron que la GalNAc y la L-fucosa son los determinantes antigénicos de los grupos A y O respectivamente.

Desde la década de los años sesenta, se han realizado una serie de descubrimientos que han permitido el avance en el estudio de las lectinas; así por ejemplo, se ha encontrado que las lectinas no sólo se encuentran confinadas al reino vegetal, sino que también se encuentran distribuidas en microorganismos, animales vertebrados e invertebrados. En nuestros días se sabe bastante acerca de la distribución y características moleculares de un número importante de lectinas y se avanza en el estudio de la estructura y función de las mismas.

ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS.

Summer y Howell en 1936 descubrieron que la Con A tenía la capacidad de precipitar al glicógeno en solución y la interacción con azúcares inhibía la actividad hemaglutinante. Esto permitió sentar las bases para identificar que la interacción de las lectinas con los eritrocitos es mediada por el reconocimiento específico de residuos sacarídicos de la membrana. La inhibición de las lectinas por monosacáridos fué evaluada por Watkins y Morgan en 1952 y posteriormente por Kruppe en 1956, quienes demostraron que las lectinas específicas por grupos sanguíneos (especificidad serológica), también poseen una especificidad por azúcares simples (especificidad

química). Existe un grupo importante y quizá el más abundante, de lectinas que no poseen especificidad serológica y que son inhibidos por varios azúcares.

En 1957 Makela¹⁸ reportó la especificidad serológica de 52 lectinas de la familia de las leguminosas y utilizando diferentes azúcares para inhibir la actividad hemaglutinante de dichas lectinas, encontró que, en general, las lectinas reconocen azúcares en forma piránica y propuso una clasificación de las lectinas basada en la interacción de las lectinas con la configuración de los grupos hidróxilo de los carbonos 3 y 4 de los carbohidratos. Así por ejemplo, la lectina de *Lotus tetragonobulus* y la lectina de *Ulex europeus* son inhibidas por monosacáridos pertenecientes al grupo 1 (figura 1), mientras que la lectina de *R. comunis* presenta afinidad por monosacáridos que se encuentran en el grupo 2. Los monosacáridos clasificados en el grupo 3, inhiben a lectinas que tienen especificidad por glucosa y manosa; de esta clasificación tenemos varios ejemplos de lectinas, como la lectina de soya, que reconoce una variación a nivel de los carbonos 3 y 4 del azúcar. Podemos distinguir entre lectinas que reconocen galactosa y galactosamina o entre la glucosa y la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), ya que mientras el hidróxilo de la galactosa en C4 se encuentra en posición axial, el equivalente en la glucosa se encuentra en posición ecuatorial. Esta clasificación de las lectinas era limitada porque dejaba afuera a lectinas que presentaban una especificidad por estructuras oligosacáridicas complejas, tal como la lectina Con A y la lectina *Lens culinaris* (LCA). La conformación del carbono anomérico también resulta importante para la interacción de estas lectinas que reconocen preferentemente a los α -manósidos que a los β -manósidos mientras que lectinas, como la lectina de *Helix pomatia*, tienen la capacidad de reconocer las formas anoméricas α o β ¹⁹, con la misma afinidad; la

presencia de un grupo acetamido a nivel del carbono 2 juega un papel importante en el mecanismo de reconocimiento, que en conjunto con las variaciones en los carbonos 3 y 4 permite el reconocimiento para GalNAc y GlcNAc.

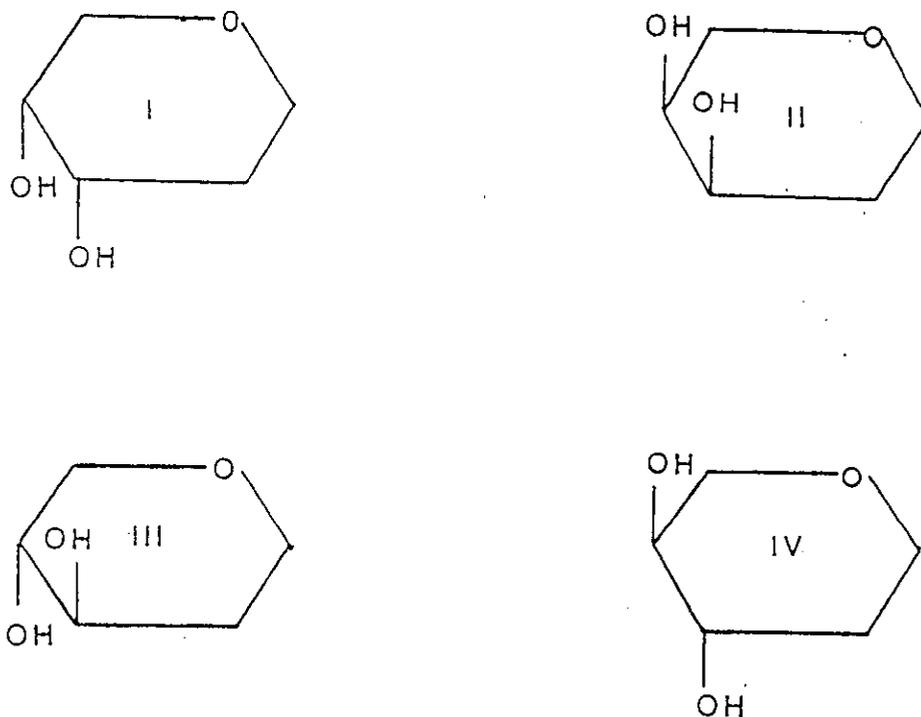


Figura 1. Estructuras de monosacáridos propuestas por Makela¹⁸ para la clasificación de lectinas.

y la estructura tridimensional de la lectina y debido a la gran especificidad que poseen, presentan una gran variedad de actividades biológicas.

ESTRUCTURA.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas que se caracterizan por reconocer específicamente carbohidratos, con los cuales presentan una baja fuerza de asociación. Se ha logrado determinar que existen características comunes entre las lectinas de una especie vegetal o animal determinada, lo que ha permitido el estudio de la interacción lectina-carbohidrato. Las lectinas aisladas de la familia de las leguminosas, poseen una alta homología en secuencias de aminoácidos ²¹⁻²⁸, en estructuras secundarias ²⁹⁻³¹, así como en organización tridimensional ³²⁻³⁸. Una de las características estructurales ampliamente estudiada es el dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD)³⁹, que consiste de aproximadamente unos 200 aminoácidos, altamente homólogos en lectinas de la misma familia y en donde se establece la interacción carbohidrato-lectina. Una característica importante es que la especificidad de las lectinas, la mayor parte de las veces, está dirigida no solamente hacia monosacáridos como un primer sitio de reconocimiento; en general poseen una constante de disociación del orden 0.1 a 1 mM y un sitio de reconocimiento hacia secuencias sacarídicas específicas, las cuales en diversas ocasiones son estructuras oligosacarídicas complejas, que presentan constantes de disociación en concentraciones micromolares. En todos estos casos, los carbohidratos interactúan con el primer y segundo sitio de reconocimiento (sitio extendido). La afinidad de las lectinas también aumenta debido a la multivalencia, en la cual las subunidades de una lectina se asocian para formar dímeros o tetrámeros. Así por ejemplo tenemos que, en general, las unidades monoméricas de las lectinas de leguminosas tienen un peso

molecular de aproximadamente 25 kDa, la mayoría están compuestos por seis hojas antiparalelas β -plegadas, mientras que el arreglo más común en la dimerización lo constituyen 12 hojas antiparalelas β -plegadas, conocido como el dominio canónico, identificado en las lectinas de *Lothyrus ochrus* (LOL) y Con A. La organización tetramérica de estas lectinas provoca que tengan efectos biológicos distintos a otras lectinas con arreglos estructurales semejantes y existen lectinas como la de cacahuate (*Arachis hypogaea*, PNA) que presenta un arreglo tetramérico pero cuyos dímeros no tienen el arreglo observado en la lectina LOL-1⁴⁰.

Particularmente, las lectinas obtenidas de cereales como el germen de trigo (WGA) merecen un comentario diferente al de las leguminosas. En primer lugar estas lectinas a diferencia de prácticamente todas las lectinas vegetales reportadas, posee residuos de cisteína, sin que participen en uniones disulfuro entre las subunidades, cada monómero tiene cuatro secuencias repetidas de 43 aminoácidos que forman un isodominio (A,B,C y D), que se unen entre sí en forma de cabeza-tallo, resultando un apareamiento de subdominios A1/D2, B1/C2, C1/B2 y D1/A2, dando un arreglo tridimensional muy diferente al observado en leguminosas⁴⁰. Estas variaciones estructurales explican parcialmente la razón por la cual algunas lectinas, provenientes de distintas especies y que reconocen un mismo monosacárido, como por ejemplo, GalNAc para la lectina de soya (leguminosas) y la lectina del champiñón (*Agaricus bisporus*), tienen diferentes efectos biológicos.

EL AMARANTO.

La planta de amaranto fue importante para la economía primitiva de varias

culturas de América y de Asia en donde se cultivaba extensamente en las altiplanicies. Actualmente sólo la India y México conservan su cultivo. La especie *A. leucocarpus* (syn. *A. hypocondriacus*) se encuentra en México y en el sureste de los Estados Unidos de América, *A. cruentus* en Guatemala y *A. caudatus* en Perú y Bolivia. El valor nutritivo del amaranto ha sido comprobado a partir de diversos estudios realizados sobre su composición química. En dichos estudios se ha determinado la presencia de aminoácidos, aceites esenciales, vitaminas y minerales, en semilla, tallos y hoja⁴¹⁻⁴². La proteína (Tabla No.1), que se obtiene de la semilla de amaranto es rica en lisina, isoleucina y treonina. En relación al patrón de aminoácidos planteado por la FAO/OMS, el porcentaje más alto en cuanto a composición química, le corresponde a la especie *A. leucocarpus* (73-80%); en cuanto a minerales (Tabla No.2), el amaranto contiene calcio, fósforo, zinc, hierro y sobre todo magnesio, mientras que en vitaminas (Tabla No.3), destaca moderadamente la tiamina.

Tabla 1
CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS EN LAS PROTEÍNAS DE SEMILLAS
DE DISTINTAS ESPECIES DE Amaranto

Especie	Leucocarpus	Caudatus	Cruentus	Edulis	Patrón *
Valina	4-4.6	4.1	3.6	3.8	5
Isoleucina	3.8-4.1	3.6	5.1	3.3	4
Leucina	6.0-6.8	5.3	3.4	5.1	7
Treonina	3.6-3.9	3.5	6.0	3.2	4
Aromáticos	8.0-10	6.2	4.0	6.6	6
Lisina	3.8-6.4	5.3	0	4.8	5.5
Triptofano	0.45-1	0	0	0.9	1.0

• Patrón provisional. FAO/OMS 1977

Tabla 2
ELEMENTOS INORGÁNICOS EN SEMILLAS DE DISTINTAS ESPECIES DE
Amaranto (mg/Kg o ppm).

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

Tabla 3
CONCENTRACIÓN MEDIA DE ALGUNAS VITAMINAS EN SEMILLAS DE
DISTINTAS ESPECIES DE Amaranto (mg/100g).

Tiamina	0.25-0.90
Riboflavina	0.03-0.29
Niacina	1.00-2.10
Vitamina C	1.70-2.80

Patrón provisional FAO/OMS 1977.

En México, *A. leucocarpus* es la especie más cultivada de la familia de las Amarantáceas, es considerada como un pseudocereal, debido a su contenido de cisteína. Esta familia comprende plantas herbáceas anuales y agresivas que crecen en clima cálido, compuestas por hojas simples y flores pequeñas dispuestas en espigas. Esta familia contiene más de 50 géneros y alrededor de 900 especies. De esta familia se han logrado obtener lectinas de las especies de *A. caudatus*⁴³ y de *A. cruentus*⁴⁴, las cuales presentan similitudes estructurales, tales como la presencia de dos subunidades monoméricas de 30-

35 kDa que en estado nativo forman un homodímero de 70 kDa, y lo más importante es que ambas son inhibidas por GalNAc y ninguna de las dos presenta especificidad por los grupos sanguíneos A,B,O. Estas características son compartidas por lectina aislada de *A. leucocarpus*, la cual también induce inmunosupresión en animales y transformación mitogénica en linfocitos murinos, principalmente en timocitos de la médula ósea⁴⁵, mientras que la lectina de *A. caudatus* no ejerce ningún efecto en linfocitos⁴³.

Trabajos recientes han aportado evidencias que indican que la lectina de *A. leucocarpus* reconoce de manera específica timocitos murinos localizados en la médula tímica, y son en su gran mayoría linfocitos ayudadores o CD4⁴⁶. Este reconocimiento no es compartido por lectinas que reconocen GalNAc; así por ejemplo, la lectina de cacahuete (*A. hypogaea*), reconoce timocitos que se encuentran en la corteza de la médula tímica que no expresan ningún fenotipo y que son eliminados por apoptosis.

OBJETIVOS

Estudiar las propiedades químicas y estructurales que intervienen en el reconocimiento de la lectina de *A. leuocarpus* con su receptor.

METAS

- 1.- Obtener un método óptimo para la purificación de la lectina.
- 2.- Determinar la estructura secundaria de la lectina.
- 3.- Determinar la especificidad de la lectina hacia eritrocitos humanos.
- 4.- Determinar la especificidad de la lectina hacia estructuras oligosacáridicas complejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

La semilla de *Amaranthus leucocarpus* se obtuvo en Tulyehualco, México. Los reactivos de grado analítico fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo. USA). Las matrices cromatográficas fueron obtenidas en Pharmacia (Uppsala, Suecia).

EXTRACCION DE LA LECTINA.

La extracción de la lectina se realizó de la harina de semillas de amaranto. La semilla se molió en un molino para café (Moulinex) hasta obtener una harina fina, la cual fue deslipidizada con 3 extracciones de éter de petróleo, las fracciones etéreas se eliminaron y la harina se dejó secar. A 10 g de harina de amaranto deslipidizada se le adicionaron 100 ml de solución salina isotónica (NaCl 0.15 M, SSI), y se agitó durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se ajustó el pH a 4 con ácido acético concentrado y se dejó reposar por 24 horas a 4°C. La mezcla fue centrifugada a 20,000 g durante 15 minutos para eliminar el material sólido y al sobrenadante cristalino que es referido como extracto crudo se hizo una saturación fraccionada con sulfato de amonio; inicialmente el extracto crudo se saturó al 35%, manteniéndolo en agitación durante 2 horas a 4°C, luego se centrifugó a 20,000 g durante 15 minutos y el material precipitado se resuspendió en el menor volumen posible con SSI y se dializó exhaustivamente contra SSI hasta que el ensayo con cloruro de Bario saturado fue negativo. El sobrenadante se saturó al 65% con sulfato de amonio, se centrifugó y se dializó con SSI; de la misma forma al sobrenadante de ésta fracción se le agregó sulfato de amonio al 100% de saturación y el material precipitado se dializó con el procedimiento ya descrito. A cada fracción dializada se le determinó la concentración de proteína y la actividad hemaglutinante.

PURIFICACION DE LA LECTINA.

La purificación de la lectina se realizó por medio de cromatografía de afinidad utilizando tres columnas preparadas con diferentes ligandos, una conteniendo estroma de eritrocitos humanos del tipo O, inmovilizados en Sephadex G-25, otra con fetuína acoplada a Sepharosa y la última con IgA humana acoplada a Sepharose.

.Purificacion de la lectina con estroma de eritrocitos 0 humanos.

Para obtener el estroma se utilizaron 450 ml de sangre humana tipo O, obtenida del banco de sangre del Centro Médico Nacional Siglo XXI, la cual se centrifugó a 1,500 rpm durante 10 minutos para extraer el plasma y dejar únicamente el paquete de eritrocitos. El paquete eritrocitario se lavó tres veces con SSI y se centrifugó a 1,500 g a 4°C, durante 20 minutos. El lisado se realizó por choque hipotónico con una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.4 en una relación de 9:1 fosfatos/paquete eritrocitario respectivamente y se agitó durante 30 minutos a 4°C. Esta mezcla se centrifugó a 20,000 g durante 10 minutos a 4°C y el precipitado se lavó repetidamente con agua destilada y finalmente con SSI⁴⁷ hasta eliminar los residuos de hemoglobina,

El paquete de estroma fue tratado para eliminar los residuos de ácido siálico mediante hidrólisis ácida, para lo cual se añadieron 100 ml de ácido sulfúrico 0.002N al paquete de estroma, agitándose durante dos horas a 80°C, se dejó enfriar y la reacción se neutralizó por la adición de NaOH 1 M.

El paquete de estroma desializado se lavó con SSI y posteriormente recibió un tratamiento químico que permite rigidizar a la membrana: se adicionó glutaraldehído al paquete de estroma a una concentración final del 1% en un amortiguador de fosfatos 10 mM, 0.15 M NaCl pH 7.4, se dejó en agitación durante 24 horas a 4°C; posteriormente el

exceso de glutaraldehído se eliminó mediante lavados con SSI y centrifugación a 1,500 g, finalmente se agregó glicina 1M para bloquear todos los grupos aldehído libres, la mezcla se agitó durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, el paquete de membranas tratadas con glutaraldehído fue lavado con SSI y centrifugado durante 15 minutos a 7,000 g. Una vez tratado el estroma, se mezcló con Sephadex G-25 superfino en una relación 1:10 (estroma/Sephadex) para inmovilizar físicamente a las membranas; esta mezcla se aplicó a una columna de vidrio de 1.6 x 50 cm y se lavó con SSI, ácido acético al 3% y finalmente la columna se equilibró con SSI⁴⁸

A la columna de estroma se aplicó 20 ml del extracto crudo, la fracción no retenida (FNR), fue eluída con SSI hasta que la densidad óptica a 280 nm fue menor de 0.001 (espectrofotómetro Beckman DU-640). Posteriormente la columna fue lavada con cuatro volúmenes de SSI y la lectina fue eluída mediante la adición de 10 ml de ácido acético al 3% y finalmente se agregó agua destilada. El procedimiento se desarrolló con un flujo de 18 ml/h y se colectaron fracciones de 5 ml. A las fracciones colectadas se les determinó absorbencia a 280 nm y actividad aglutinante. Para esto último se les ajustó la fuerza iónica y el pH con 0.5 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH 7.2 con 0.15 M de cloruro de sodio, las fracciones colectadas se dializaron con agua, se liofilizaron y se guardaron hasta su utilización.

Purificación de la lectina con fetuína e inmunoglobulina A-acopladas a Sepharose.

Para la preparación de las columnas de Sepharose unidas a fetuína o IgA, se utilizó la activación por bromuro de cianógeno⁴⁹; 100 ml de Sepharose 4B (Pharmacia) se lavó con agua destilada fría, el gel fue resuspendido en 100 ml de bicarbonato de potasio 2M, se agitó constantemente en un baño a 4°C. Para activar la Sepharose se agregó una

solución de bromuro de cianógeno (250 mg/ml de Sepharose) disueltos en 1 ml de acetonitrilo, se agitó durante 2 minutos, se lavó 4 veces con agua fría para eliminar el exceso de bromuro de cianógeno y se resuspendió en 100 ml de bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.5 conteniendo 200 mg de fetuina o IgA (10 mg de proteína por cada ml de Sepharosa activada) y se dejó agitar durante 24 horas a 4°C. Posteriormente el gel se lavó con agua fría y bicarbonato de sodio 0.1 M para eliminar el exceso de proteína. Para bloquear el exceso de grupos ácidos, se realizó una incubación con 1 M de glicina durante dos horas, el gel se lavó con agua fría y bicarbonato de sodio 0.1 M; una vez acoplada la fetuina o la IgA, el proceso de purificación de la lectina fue como sigue: Se utilizaron columnas de 1.2 x 20 cm las cuales contenían fetuina o IgA-sepharose, se aplicaron 10 ml de extracto crudo de amaranto, la fracción no retenida fue eluida con SSI, hasta que la densidad a 280 nm fuera menor de 0.001; la fracción retenida fue eluida con ácido acético al 3%. La velocidad de flujo de cada columna se ajustó a 10 ml/h y se colectaron fracciones de 3 ml. Para ajustar el pH se agregó a cada fracción 0.5 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 10 mM, 0.15 M NaCl pH 7.4, antes de determinar la actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos humanos O y posteriormente se determinó la concentración de proteínas. Las fracciones colectadas se dializaron con agua destilada, se liofilizaron y se guardaron hasta su utilización.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.

Determinación de proteína

La concentración de proteínas fue determinada por el método colorimétrico de Bradford⁵⁰. La solución está compuesta por 100 mg de azul de Coomassie G-250 disueltos en 50 ml de etanol al 95%, 100 ml de ácido fosfórico al 85%, se aforó a un litro

en agua destilada y finalmente se filtró. Para la elaboración de la curva estándar, se utilizó albúmina sérica bovina cristalizada (BSA); a la muestra se le agregó 900 μ l del reactivo de Bradford y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, las muestras se leyeron a 595 nm.

Determinación del peso molecular por SDS-PAGE.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de acuerdo al método descrito por Laemmli⁵³. Se empleó una cámara de electroforesis SE 245 Mighty Small Dual Gel Caster, BioRad, (Richmond Ca. USA). Primero se preparó la solución de poliacrilamida, para el gel de separación al 12%, mezclando 1.435 ml de agua destilada, 2.8 ml de poliacrilamida al 30%, 2.625 ml de Tris 1M pH 8.8, 0.070 ml de Lauril Sulfato de Sodio, 0.07 ml de persulfato de amonio al 10% y 0.04 ml de TEMED. La solución se mezcló y se vació entre las placas de vidrio hasta 2 cm antes del tope, agregando después agua destilada para evitar la formación de menisco; una vez polimerizado el gel, se retiró el agua.

El gel concentrador se preparó de la siguiente manera: se mezcló 1.05ml de agua destilada, 0.25 ml de poliacrilamida al 30%, 0.19 ml de Tris 1 M pH 6.8, 0.015 ml de Lauril sulfato de sodio, 0.015 ml de persulfato de amonio al 10% y 0.03 ml de TEMED, esta mezcla se agregó entre los dos vidrios y de inmediato se sumergió el peine de teflón, una vez polimerizado el gel, se retiró el peine.

Se disolvieron 100 μ g de lectina en 50 μ l del amortiguador para muestras (glicerol 200 μ l, 2-mercaptoetanol 100 μ l, SDS al 20% 230 μ l, TRIS a pH 6.8 125 μ l, azul de bromofenol al 0.1% 100 μ l y agua destilada 245 μ l), calentado a 80°C durante 5 minutos. Se colocaron las placas en la cámara vertical de electroforesis, enseguida se llenaron las

placas con el buffer de corrimiento (Tris 1.52 g, glicina 7.21 g, SDS al 10% 5 ml y 500 ml de agua destilada), después se procedió a colocar 10 μ l de la muestra y 3 μ l de los marcadores de peso molecular en cada uno de los pozos del gel; se cerró la cámara y se conectaron los electrodos a la fuente de poder (LKB 2197), suministrando un voltaje constante de 150 V, suspendiendo éste cuando el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel.

El gel se tiñó 24 horas en agitación constante con azul de Comassie y se eliminó el exceso de colorante con lavados de 15 minutos con una solución de metanol-ácido acético-agua (250/50/200 ml).

Composición de aminoácidos.

100 μ g de lectina purificada por cromatografía de afinidad usando estroma de eritrocitos como ligando, en 50 μ l de agua destilada, se hidrolizó al vacío en tubos sellados conteniendo 2 ml de ácido clorhídrico 6 M a 110°C durante 24, 48 y 72 horas, el pH de las muestras fue neutralizado y posteriormente aplicadas en un analizador automático de aminoácidos (Durrum D-500), usando como estándar interno NorLeucina, la derivación se hizo por triplicado en una estación PicoTag Waters ⁵¹ y la composición de aminoácidos obtenidos representa la media de tres inyecciones de cada muestra.

Determinación del Amino terminal.

Con la finalidad de comparar la similitud de la lectina de *A. leucocarpus* con lectinas de las familias leguminosas y gramíneas, la lectina purificada fue sometida a secuenciación de aminoácidos para obtener el amino terminal. Se corrieron geles de poliacrilamida-SDS y la banda se transfirió a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinileno), la cual fue sometida a degradación con el reactivo de Edman en un

secuenciador de fase gaseosa Beckman LS3000.

Obtención de glicopéptidos de la lectina.

10 mg de la lectina en 2 ml de buffer de fosfatos a pH de 7, fueron incubados con un mg de pronasa (proteasa de *Streptomyces griseus*), se incubó durante 48 horas a 37°C, se agregó a las 24 horas de incubación un mg de enzima. Posteriormente, la mezcla de glicopéptidos se centrifugó a 20,000 g durante 15 minutos y el sobrenadante fue pasado por una columna de BIOGEL P-2 (1.2 x 100 cm), equilibrada previamente con agua, a una velocidad de 10 ml/h, la presencia de glicopéptidos se determinó espectrofotométricamente a tres longitudes de onda, 206 nm, 215 nm y 280 nm.

A los glicopéptidos obtenidos se les reconstituyó la fuerza iónica con amortiguador de fosfatos 10 mM, 0.15 M de NaCl pH 7.4 y fueron purificados por cromatografía de afinidad con tres lectinas: Con A (específica para oligomanósidos), LCA (específica para oligomanósidos con L-fucosa en su estructura) y *Phaseolus cocineus* (específica para secuencias oligosacáridicas Gal β 1-4 o GlcNac β 1-3 β 1-2 Man α 1-de tipo acetil-lactosamínicas)⁵⁸. Los glicopéptidos fueron obtenidos aplicando a cada una de las columnas 10 ml del monosacárido (0.2 M), reconocido por las lectinas, α -metilmanósido para la lectina de Con A, glucosa para la lectina de LCA y GalNac para la lectina de alubia. Las fracciones eluidas de cada columna se concentraron por evaporación y se eliminó la sal en la columna de Biogel P-2 (1.2 x 100), con un flujo de 10 ml/h, las fracciones obtenidas fueron liofilizadas y analizadas para obtener la composición de carbohidratos.

Composición de carbohidratos.

La composición de carbohidratos se determinó a partir de la formación de derivados trifluoroacetil-alditales y analizados por cromatografía de gases⁵². La hidrólisis de las muestras se realizó incubándolas en metanol-ácido clorhídrico 0.5 M durante 24 horas a 110°C, posteriormente se neutralizó el pH con carbonato de plata y las fracciones se re-N-acetilaron con 5 µl de anhídrido acético, se conservaron en obscuridad toda la noche y posteriormente se deslipidizaron con heptano. Estas fracciones fueron secadas con helio y se les agregó 10 µl de ácido trifluoroacético y 10 µl de piridina. Los derivados trifluoroacetil-alditales fueron analizados en un cromatógrafo de gases (Varian serie 1400, Ca USA) equipado con una columna conteniendo el 5% de silicón OV-210, se utilizó nitrógeno como gas acarreador. Se utilizó un programa de temperatura de 100°C a 220°C con un incremento en la temperatura cada tres minutos. Como estándar interno se utilizó Mio-inositol.

MODIFICACION QUIMICA DE LA LECTINA.

Succinilación

La succinilación modifica los residuos de cisteína, histidina y treonina⁵³. La modificación de estos residuos se realizó de la manera siguiente: un mg de lectina fue disuelto en un ml de amortiguador de carbonatos 1 M, pH 8. Se le agregó un mg de anhídrido succínico y después de su completa disolución, la reacción se dejó continuar durante dos horas; para detener la reacción se agregó un ml de agua destilada y el exceso del anhídrido fue eliminado dializando la muestra en contra de agua destilada. A la muestra dializada se le determinó la concentración de proteína y se comparó la actividad hemaglutinante con lectina disuelta en carbonatos 1 M pH 8.

Carboximetilación.

La carboximetilación modifica principalmente a los residuos de cisteína. Esta reacción se realizó según el método descrito por Creighton ⁵⁴ bajo las siguientes condiciones: un mg de lectina se disolvió en una solución que contenía 500 µl de Tris-HCl pH 8.0, EDTA .01 M pH de 7 y Ditiotreitól (DDT 1M), se incubó durante una hora a 37°C. Posteriormente se agregó 100 µl de iodoacetamida, la cual reacciona con los grupos SH sin alterar la carga, ya que da como resultado un grupo H₂NCOSH₂S- el cual es neutro. Finalmente la lectina modificada se dializó contra agua destilada y se midió la actividad hemaglutinante.

Oxidación con metaperiodato

A 2 mg de lectina en 2 ml buffer de acetatos 0.05 M pH 4.5, se les agregaron 2 ml de metaperiodato de sodio 0.25M disuelto en el mismo buffer; la oxidación se llevó a cabo en la oscuridad a 4°C. Para confirmar el efecto de la modificación química, se tomaron alícuotas de 500 µl a diferentes intervalos de tiempo: a los 30, 60, 90, min, 2, 4, 6, 8 y 24 horas y para detener la reacción, a cada una de las alícuotas se les agregó 50 µl de polietilenglicol. Posteriormente las alícuotas se dializaron contra agua destilada y se les determinó actividad hemaglutinante.

Desglucosilación.

La enzima endo F de *Flavobacterium meningosepticum* corta estructuras que contienen principalmente⁵⁵ residuos oligomanósidos (una unidad de enzima hidroliza un µm de Dansil-Asn-GlcNac₂- Man₅; la reacción fue la siguiente: se tomaron 50µl de una solución conteniendo 100 µg/ml (1.4 nmol, con aproximadamente 0.14 nmol de azúcares en su composición de lectina), en buffer de citratos 10 mM a pH 5.5 y se incubó con 0.5,

1 y 115 unidades de endo F a 37°C durante 24 horas, después de lo cual se le ajustó el pH a 7 con hidróxido de sodio para inactivar a la enzima y se midió la actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos humanos O (M positivos).

PURIFICACION DE ISOFORMAS DE LA LECTINA

Con la lectina purificada por cromatografía de afinidad con estroma de eritrocitos humanos del tipo O, se procedió a obtener isoformas de la lectina mediante sistemas cromatográficos FPLC (Pharmacia) y HPLC (Gilson).

Para la obtención de isoformas de la lectina por medio del sistema FPLC, se utilizó una columna de intercambio iónico Mono P (Pharmacia), utilizada regularmente para cromatoenfoco en un rango de pH 9-4; además, funciona como un intercambiador aniónico. En este caso, la obtención de isoformas se realizó bajo los dos métodos. Como cromatoenfoco nos permitió determinar el punto isoeléctrico de la lectina, se utilizaron anfólinas con un rango de 7 a 4 (Pharmacia) para hacer el gradiente de pH, la lectina se disolvió en un buffer de bis-tris pH 7.3 10 mM, el pH se ajustó con ácido imidoacético; la velocidad de flujo fue de 0.5 ml/min y 2 MPa de presión. Las fracciones, de 1 ml cada una, se monitorearon a 280 nm con una sensibilidad de 0.1.

Para utilizar a la columna Mono P como intercambiador iónico se utilizó un gradiente de NaCl, para ésto la lectina se disolvió en buffer de imidazol 10 mM ajustando el pH a 7 con ácido acético, inyectándose al FPLC y formándose un gradiente con NaCl, disuelto en buffer de imidazol 10 mM pH 7, el flujo se ajustó a 0.5 ml/min y 2 MPa de presión, las fracciones se monitorearon a 280 nm con una sensibilidad de 0.1.

Para la obtención de isoformas por HPLC, se utilizó una columna de intercambio aniónico spherogel TSK DEAE (Beckman), la lectina se disolvió en un buffer de

imidazol 10 mM, ajustándose el pH a 7 con ácido acético y se formó un gradiente de NaCl disuelto en el mismo buffer; el flujo se ajustó a 1ml/min y las fracciones se monitorearon a 280 nm con una sensibilidad de 0.1.

ESPECTRO DE DICROISMO CIRCULAR DE LA LECTINA.

Para obtener el espectro de dicroísmo circular se utilizó un espectropolarímetro marca AVIV (New York, USA). Se disolvieron 300 µg/ml de lectina en buffer de fosfatos 30 mM pH 7.0 y la absorbencia fue leída en la región lejana del UV desde 250 nm hasta 180 nm, el análisis de la estructura secundaria se realizó con el programa PROCEC 3.1

Para el cálculo de la elipticidad molar media por residuo se emplearon las siguientes fórmulas.

θ molar media por residuo: $\theta_{\text{experimental}}$

$$\text{MCR} \times \text{P} \times 10$$

P es el paso de luz de la cubeta utilizada en el experimento que en este caso fue de 0.1cm. **MRC** es la elipticidad molar media por residuo y está dada por la siguiente fórmula:

MCR: Concentración de proteína en mg/ml x el número de aminoácidos

Peso molecular de la proteína x el número de cadenas.

El valor obtenido de esta fórmula se multiplica por la θ experimental, la cual es medida por el espectropolarímetro, para corregir los datos experimentales y así obtener la elipticidad molar media.

ESTUDIOS DE LA ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA.

Actividad hemaglutinante

Los eritrocitos humanos usados para este análisis fueron donados por el profesor Héctor Rodríguez Moyado del Banco Central de Sangre, Centro Médico Nacional SXXI IMSS México D.F.

La actividad hemaglutinante de la lectina fue evaluada por un ensayo de doble dilución seriada. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en U (Falcon Prod., USA). Se agregaron 25 µl de SSI a cada pozo, posteriormente se tomaron 25µl de las fracciones de la lectina y se diluyeron en forma seriada, enseguida se les agregó 25 µl de una suspensión de eritrocitos al 2% (aproximadamente 2×10^6 células), se agitó ligeramente la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 2 h, después de este tiempo se leyeron los títulos de actividad por observación directa, el título de la actividad se reportó como el inverso de la última dilución con actividad hemaglutinante.

Tratamientos de los eritrocitos mediante enzimas.

500 µl de paquete de eritrocitos fueron incubados durante 30 minutos con 100 µg de pronasa (*Streptomyces griseus*) disuelta en PBS a 37 °C a un volumen final de 2 ml. Posteriormente el exceso de enzima fue eliminado mediante lavados con SSI a 1,500 g, a 4°C durante 10 minutos, finalmente la concentración de células se ajustó al 2%.

500 µl de paquete de eritrocitos fueron incubados durante 30 min con 0.1U de neuraminidasa (*Vibrio cholerae*) a 37°C. El paquete de eritrocitos se lavó con SSI y finalmente la concentración de eritrocitos se ajustó al 2%. 500 µl de paquete de

eritrocitos recibieron ambos tratamientos.

Inhibición de la actividad hemaglutinante con carbohidratos.

Se diluyeron de manera seriada 25 µl de lectina en SSI en una placa de microtitulación de 96 pozos, posteriormente, a cada dilución se le agregó 25 µl de una solución que contenía cada carbohidrato a una concentración de 100 µM; se dejó incubar durante dos horas a temperatura ambiente y finalmente se agregaron 25 µl de eritrocitos al 2%. La inhibición de la actividad hemaglutinante se apreció comparando el título de la actividad hemaglutinante de la lectina con la serie control, sin inhibidor.

Inhibición de la actividad hemaglutinante con glicoproteínas, glicopéptidos y glicanos.

Las glicoproteínas empleadas en este estudio poseen estructuras sacarídicas conocidas y fueron adquiridas de Sigma Co. La asialo-fetuína, los asialo-glicanos de la fetuína, el N-glicopéptido de la fetuína, los glicanos de IgA y los N-glicopéptidos de eritrocitos humanos fueron donados por el Dr. Henry Debray de la Universidad de Ciencias y Técnicas de Lille, Francia. La estructura de los oligosacáridos fue confirmada por resonancia magnética nuclear del protón (^1H) a 400 MHz.

Se realizaron diluciones de la lectina con SSI hasta que se obtuvo un título de 4 (4 UHA, unidades hemaglutinantes). De esta solución se aplicaron 25 µl a cada pozo de la placa de microtitulación; posteriormente se diluyeron de manera seriada 25 µl de cada glicoproteína y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente, finalmente se adicionaron a cada pozo 25 µl de eritrocitos O con fenotipo M al 2%, se incubó durante 30 minutos. Los resultados se reportaron como la concentración mínima de glicoproteína,

glicopéptido o glicano necesario para inhibir 4 unidades hemaglutinantes.

Efecto del pH en la interacción de la lectina sobre su receptor.

Para este estudio se utilizó un amortiguador "universal" de glicina 0.2M, se le ajustó el pH con NaOH o HCl 0.2N, de estas soluciones se aplicaron 25 μ l a una placa de microtitulación, formando hileras de 12 pozos por cada valor de pH; se tomaron 25 μ l de lectina disuelta en agua (2.4 μ g/ml) y se hizo la dilución seriada y se agregaron 25 μ l de eritrocitos del tipo O, con fenotipo M o N tratados previamente con glutaraldehído al 1.5%. Las lecturas se tomaron después de 30 minutos de incubación.

RESULTADOS

La lectina de la semilla *Amaranthus leucocarpus* fue purificada por cromatografía de afinidad. En este trabajo se realizó la comparación de tres tipos de ligandos, se identificó la especificidad de la lectina por oligosacáridos y por eritrocitos humanos con fenotipo conocido, se determinó la estructura secundaria, la posible participación de la porción glicánica en la estabilización de la estructura tridimensional de la lectina, así como algunos parámetros fisicoquímicos que indican características importantes para la interacción de la lectina con su receptor.

Aislamiento de la lectina.

Mediante la extracción con cloruro de sodio de la semilla de *A. leucocarpus*, se determinó que el 0.8% del peso total de la harina deslipidizada corresponde a proteína soluble, la cual tiene capacidad hemaglutinante. Regularmente el extracto salino de amaranto se aprecia como un material turbio y quiloso; cuando se disminuye el pH a 4, aparentemente se termina de precipitar el material lipídico restante, permitiendo obtener un sobrenadante cristalino.

Como un primer intento de purificación, se realizó la precipitación de la lectina con sulfato de amonio. Identificamos que la actividad hemaglutinante se precipita en un amplio rango de saturación (35-60%), aunque se logra una recuperación de más del 80% de la actividad hemaglutinante. Sin embargo, el incremento de la actividad específica, reportada como la relación de actividad hemaglutinante y la concentración de proteína, es muy bajo (Tabla 4). Este procedimiento dejó de utilizarse en los procesos sucesivos de purificación.

Tabla 4
PURIFICACION DE LA LECTINA *Amaranthus leucocarpus* POR
PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.

Fracción	Proteína Mg	UHA	Actividad específica*
(% de saturación)			
CRUDO	812	44,850	55
0-35	314	10,240	33
35-65	415	25,000	60
65-100	55	300	5
0-65	670	41,400	62

A partir de 10 g de harina.

La actividad hemaglutinante se determinó en presencia de eritrocitos del tipo O

*La actividad específica está representada por los valores de unidades hemaglutinantes (UHA) / proteína total.

Purificación de la lectina.

La purificación de la lectina se realizó por cromatografía de afinidad utilizando tres tipos de ligando: estroma de eritrocitos O inmovilizados en Sephadex G-25, IgA y fetuina acoplados a Sepharosa, obteniéndose en los tres casos dos fracciones: una no retenida, la cual no presenta actividad hemaglutinante y otra fracción que se eluye por disminución del pH del medio cromatográfico con ácido acético al 3%. Cada fracción presenta absorbencia a 280 nm y al ajustarse el pH y la fuerza iónica presenta actividad hemaglutinante (Fig. 3 y 4), con estas columnas se obtiene un rendimiento cercano al 80% en la actividad hemaglutinante y un incremento en la actividad específica de 16 veces con respecto al extracto crudo (Tabla 5.)

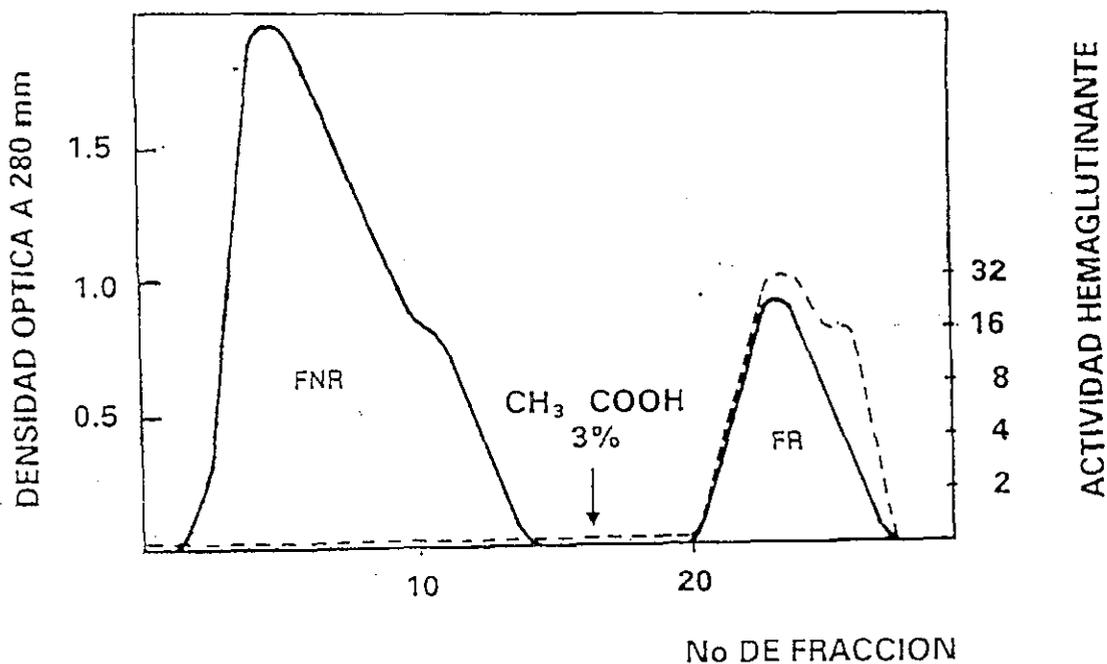


Figura 3. Perfil de elución de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por cromatografía de afinidad en estroma-Sephadex. Se aplicaron 10 ml de extracto crudo de amaranto en una columna de 1.6 x 50 cm con un flujo de 18 ml/h. La fracción no retenida (FNR) fue eluída con solución salina isotónica y la fracción retenida con ácido acético al 3%. A cada fracción de 5 ml se le midió absorbencia a 280 nm (-----) y actividad hemaglutinante (-----)

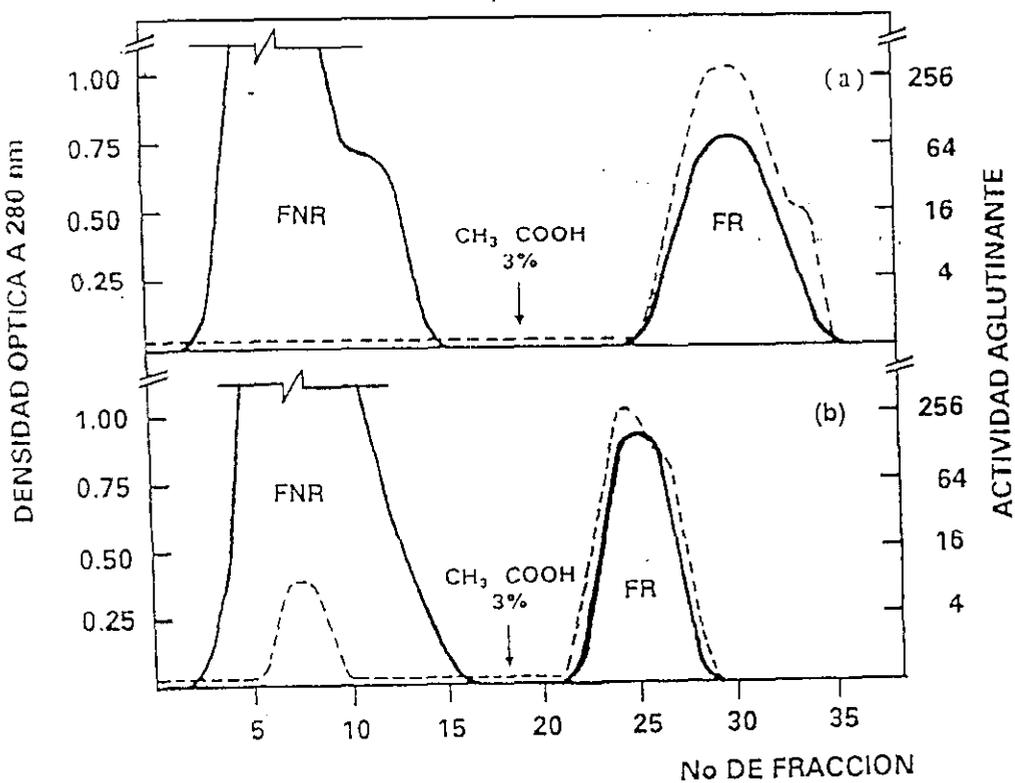


Figura 4. Perfil de elución de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* por cromatografía de afinidad en fetuina-Sepharosa (a) e IgA-Sepharosa (b). Se aplicaron 10 ml de extracto crudo de amaranto en una columna de 1.2 x 20 cm con un flujo de 10 ml/h, la fracción no retenida (FNR) fue eluida con solución salina isotónica y la fracción retenida fue eluida con ácido acético al 3%. A cada fracción de 5 ml se le midió absorbencia a 280 nm (----) y actividad hemaglutinante (- - -)

Tabla 5
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE
PURIFICACIÓN DE LA LECTINA *Amaranthus leucocarpus*.

Método de purificación	Proteína (mg)	UHA	Actividad específica.
Crudo	812	44,800	55
Precipitación*	670	41,400	62
Estroma	40	35,800	895
Fetuína	38	33,400	879
IgA sérica	40	35,000	875

*precipitación con sulfato de amonio (65% de saturación). A partir de 10 g de harina.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.

Determinación del peso molecular.

El grado de homogeneidad de las proteínas purificadas por los diferentes procesos y el peso molecular fue determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En la Figura 5 se muestra el resultado de la electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando la fracción purificada por cada proceso. De acuerdo al factor de migración comparativo con diferentes proteínas de referencia con peso molecular conocido, se logró identificar que la lectina purificada de la semilla de *A. leucocarpus* corresponde a un peso molecular de 35 kDa en condiciones desnaturizantes.

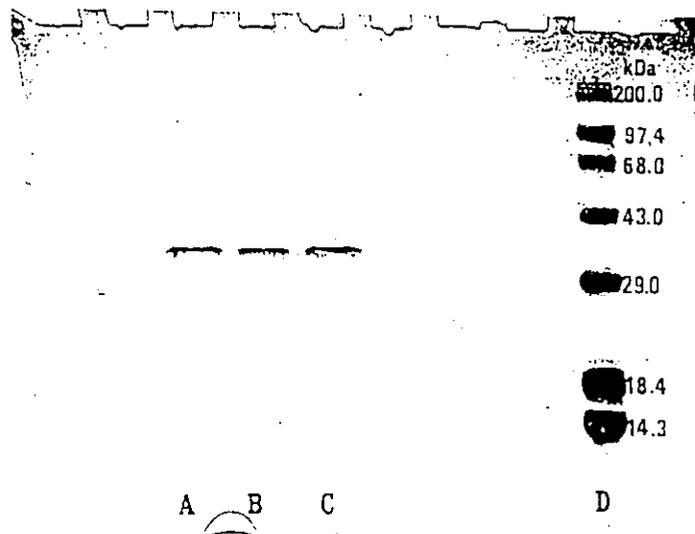


Figura 5. Determinación del peso molecular de la lectina de *A. leucocarpus* por SDS-PAGE. A) 10 μ g de lectina purificada con estroma de eritrocitos humanos acoplados a Sephadex G-25, B) 10 μ g de lectina purificada con fetuína acoplada a Sepharosa, C) 10 μ g de lectina purificada con IgA acoplada a Sepharosa, D) marcadores de peso molecular, miosina (200 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), albumina sérica (68kDa), ovoalbumina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa), lisozima (14.3 kDa).

Composición de aminoácidos.

El resultado del análisis de la composición de aminoácidos demuestra la presencia de aminoácidos no polares como la alanina, la fenilalanina y la tirosina; además, cabe mencionar la alta cantidad de aminoácidos polares (aspártico y glutámico); la cisteína es un aminoácido abundante en los cereales y que le da al amaranto la característica de pseudocereales.

Tabla 6.

COMPOSICIÓN DE AMINOACIDOS DE LA LECTINA DE *A. leucocarpus*.

AMINOACIDOS	NMol/muestra	Residuos por Subunidad
Asx	7.4	37
Thr	4.6	23
Ser	4.8	24
Glx	7.3	37
Pro	0.4	2
Gly	7.0	40
Ala	7.5	38
½ Cys	0.6	3
Val	4.0	20
Met	1.3	7
Ile	3.1	16
Leu	4.8	24
Tyr	2.4	12
Phe	2.6	13
His	1.3	7
Lys	1.6	8
Arg	2.2	11
Trp	0.3	2

* Considerando un peso molecular de 35,000 Da

Amino terminal.

Cuando la lectina de Amarantho fue sometida a la degradación de Edman se encontró que el amino terminal de la lectina estaba bloqueado, lo cual se corroboró al hacer hidrólisis de la lectina, y secuenciar los péptidos obtenidos de la hidrólisis.

Obtención de glicopéptidos

Los glicopéptidos obtenidos después de la digestión con pronasa se purificaron por una columna de BIO-GEL P-2, obteniéndose tres fracciones, las dos primeras fueron utilizadas para el análisis de composición de carbohidratos y la tercera fue eliminada por el alto contenido de sales (Fig. 6). Cada una de las fracciones fueron pasadas por columnas de afinidad acopladas a lectinas con diferente especificidad. De las tres columnas utilizadas, la que tenía acoplada Con A, posee capacidad para retener dos fracciones, la primera eluida con α -metil-manósido y la segunda con ácido acético al 3% (Tabla 7)

Tabla 7
RETENCIÓN DE GLICOPÉPTIDOS DE *A. leucocarpus* EN COLUMNAS DE AFINIDAD CON LECTINAS.

COLUMNA	CON A	LCA	ALUBIA
ALL GP-1	+	-	-
ALL-GP-2	+	-	-

ALL-GP1 y ALL GP2. Son los glicopéptidos obtenidos de la columna de BIO-GEL P-2.

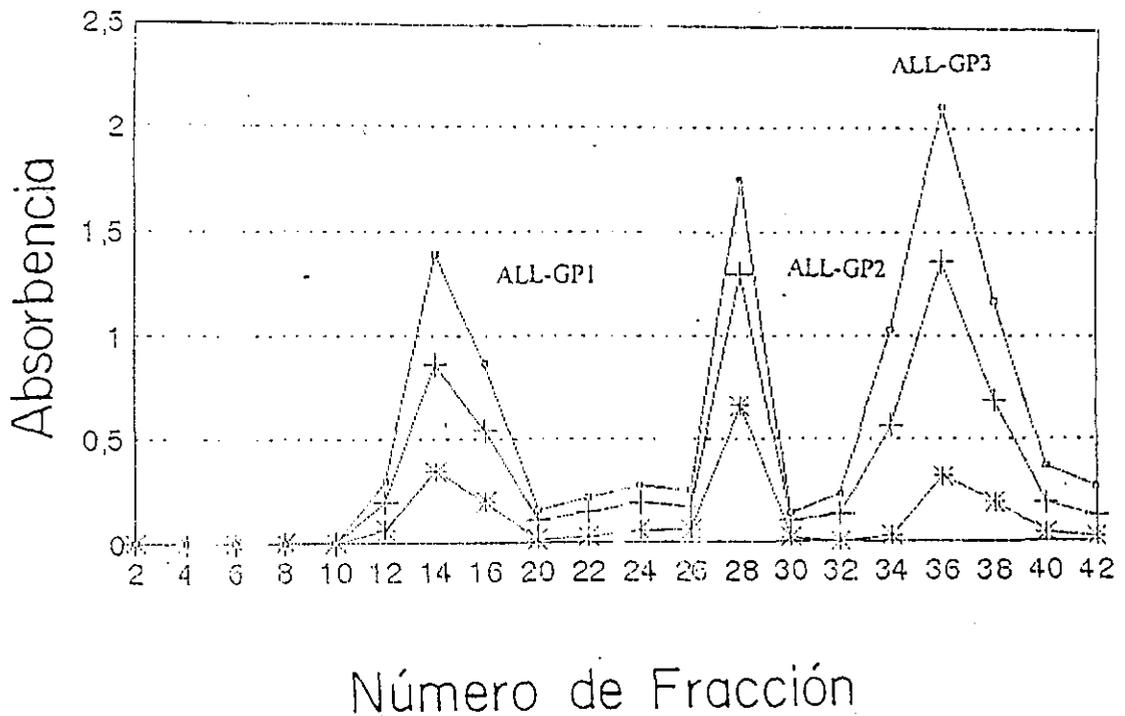


Figura 6. Perfil de elución de glicopéptidos de la lectina *Amaranthus leucocarpus* en una columna de BIOGEL P-2 de 1 cm x 80 cm, con un flujo de 10 ml/h. Las fracciones de la 10-20 corresponden al glicopéptido 1 (ALL GP-1), las fracciones de la 26-30 corresponden al glicopéptido 2 (ALL GP-2) y las fracciones 36-40 corresponden al glicopéptido 3 (ALL GP-3). Las lecturas se hicieron a tres longitudes de onda a 206 nm o, a 215 nm + y a 280 nm *

COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS.

En la figura 7 se muestra el cromatograma de los derivados trifluoroacil-alditoles de los glicopéptidos de la lectina de *A. Leucocarpus*, en los que se observa que la manosa, N-acetil-D-glucosamina y la galactosa, se encuentran en mayor proporción y en menor proporción se identificó a la xilosa (Tabla 8) representando el 10% del peso de la lectina.

Tabla 8
COMPOSICIÓN DE CARBOHIDRATOS DE GLICOPÉPTIDOS DE LA
LECTINA *A. leucocarpus*

Fracción.	Gal.	Man.	GalNac.	GlcNac.	NeuAc.	Xil.
ALL Con A	0.6	3	0	2.3	0	0.6
ALL Con A II	0	3	0	1.6	0	0
ALL Con A No retenido	0.6	3	0	1.3	0	0

Determinación del punto isoeléctrico de la lectina.

En el caso del FPLC, usando la columna mono P como intercambiador aniónico, se obtuvieron dos fracciones; la primera fracción fue eluída con 0.1 M NaCl y representa aproximadamente el 70% de la proteína que fue inyectada; la segunda fracción fue eluída con 0.18 M NaCl y representa el 30% de la proteína inyectada (fig. 8), ambas fracciones tienen absorbencia a 280 nm y actividad hemaglutinante. Utilizando la misma columna con un gradiente de pH (fig. 9), se encontró una fracción que fue eluída con un pH entre 4.8-5.4 con absorbencia a 280 nm y actividad hemaglutinante.

En el caso del HPLC (fig. 10), usando una columna TSK-spherogel como intercambiador aniónico se obtuvo una fracción que fue eluída con 0.2M NaCl, con absorbencia a 280 nm y actividad hemaglutinante.

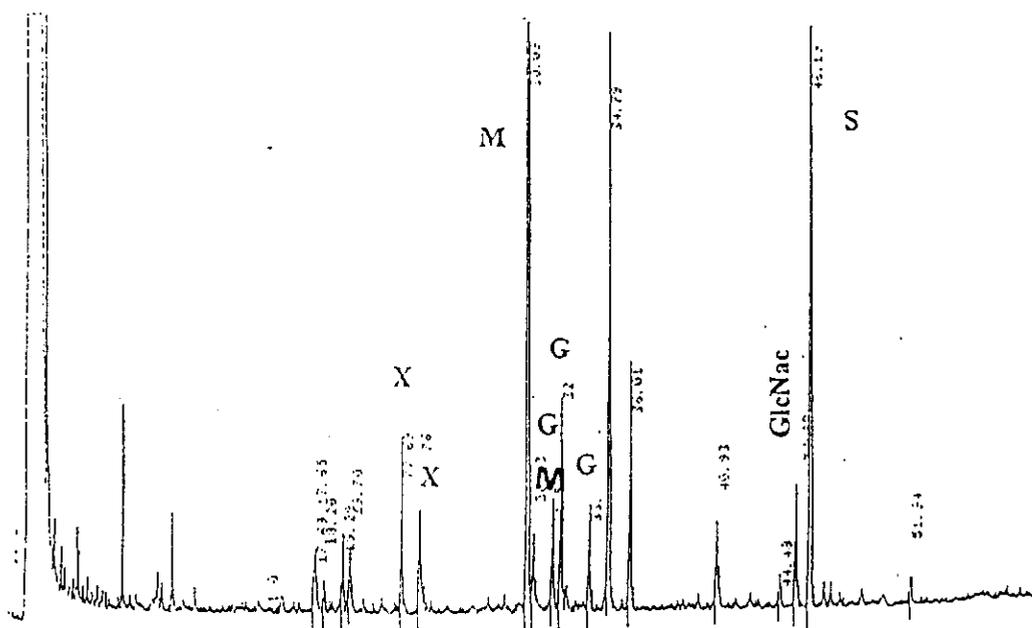


Figura 7. Cromatograma de composición de gases de los glicopéptidos de la lectina *Amaranthus leucocarpus* que fueron retenidos en la columna de *Canavalia ensiformis*. X: Xilosa, G:Galactosa, M: Manosa, GlcNac: N-acetil-glucosamina y S: Estándar de mio-inositol (1 μ g).

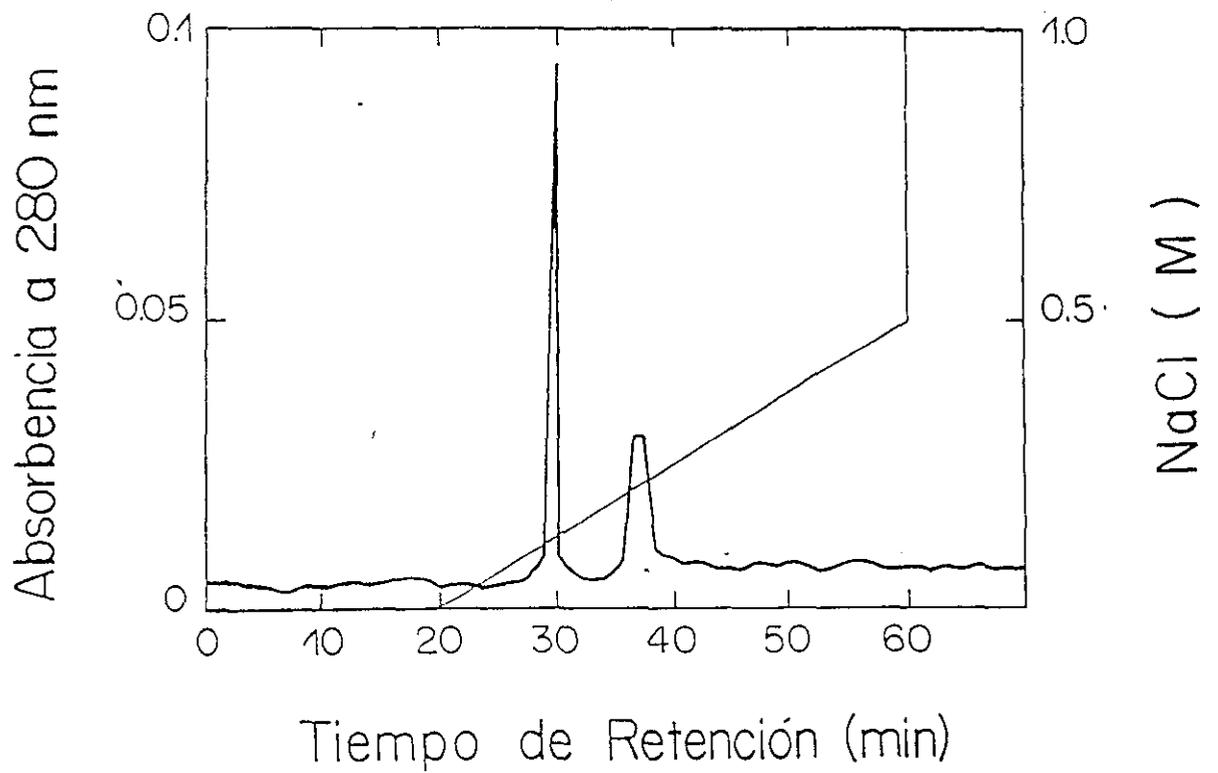


Figura 8. Cromatograma de la lectina *A. leucocarpus* obtenida por FPLC, usando una columna mono P como intercambiador aniónico, se utilizó como amortiguador imidazol 10 mM pH 7.

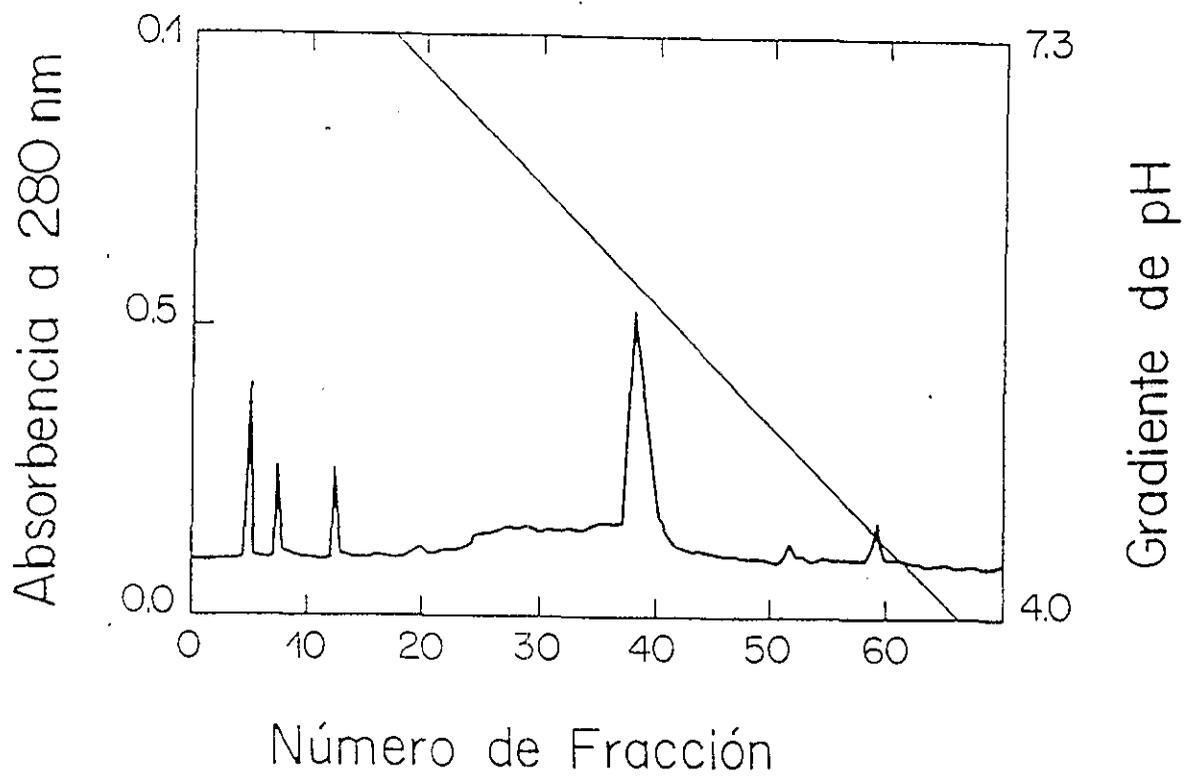


Figura 9. Cromatograma de la lectina *A. leucocarpus* obtenida por FPLC, usando una columna mono P con un gradiente de pH, se utilizaron anfolinas en un rango de pH de 9-4.

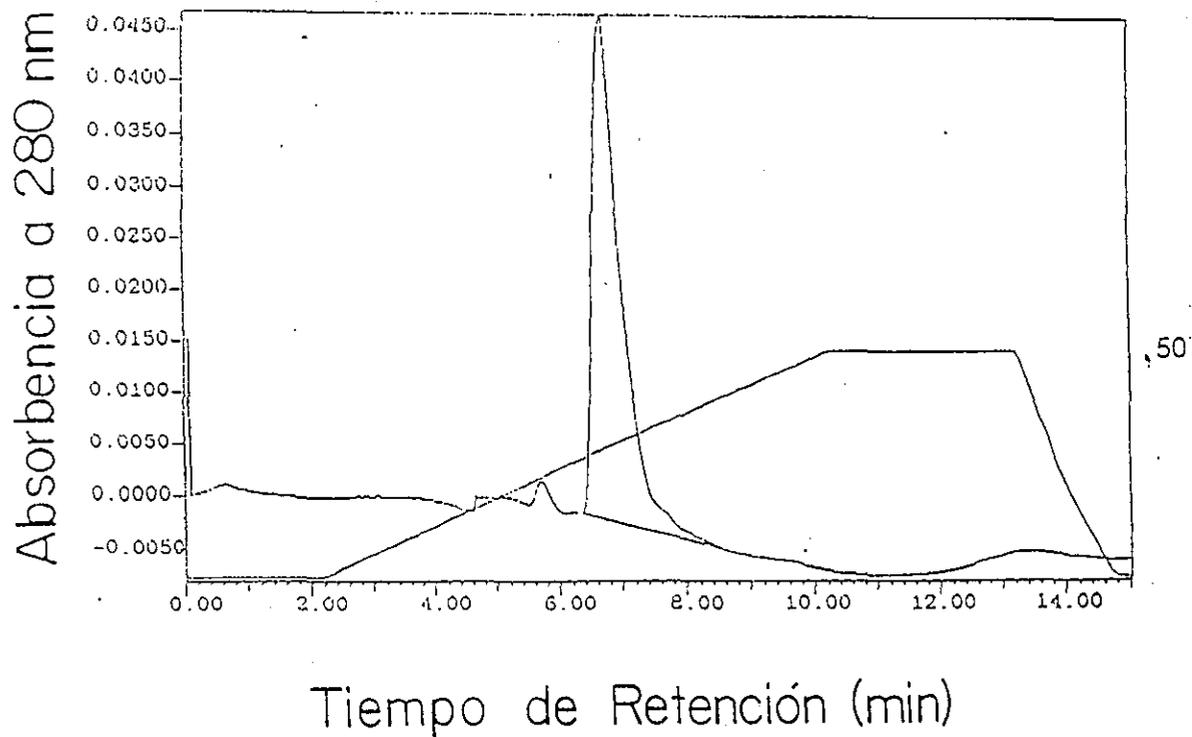


Figura 10. Cromatograma de la lectina *A. leucocarpus* obtenida por HPLC, usando una columna TSK-Spherogel como intercambiador aniónico

Modificación química de la lectina de *A. leucocarpus*.

La modificación química por succinilación y carboximetilación de la lectina de *A. leucocarpus* demuestra una disminución en el título hemaglutinante. El tratamiento con periodato disminuyó la actividad hemaglutinante de manera proporcional al tiempo de tratamiento. El tratamiento con Endo F induce una disminución importante en el título de hemaglutinación. (Tabla 9).

Tabla 9
MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA LECTINA DE *A. leucocarpus*.

Tratamiento.	Título hemaglutinante.
Control.	128
Carboximetilación.	32
Succinilación.	32
Periodato.	
30 min.	32
60 min.	16
120 min.	2
Endo F*	4

Se utilizó una unidad de enzima para digerir 100µg de lectina durante 24 hrs a 37°C

Espectro de dicroísmo circular.

En la figura 11 se muestra el espectro de dicroísmo circular de la lectina de *A. leucocarpus*, la máxima elipticidad negativa la encontramos entre los 194 y 198 nm, mientras que la máxima elipticidad positiva la encontramos cercana a los 185 nm. Este

tipo de espectro es similar al que se obtiene cuando se utilizan proteínas que son 100% hojas plegadas beta. Para calcular el contenido de este tipo de estructura se utilizó el programa PROCEC 3.0, el cual contiene una base de datos con espectros de proteínas ya reportado, encontrándose que el contenido de hojas β -plegada es de aproximadamente el 60%, existiendo la posibilidad de que otros tipos de estructuras secundarias, como alfa hélices y giros contribuyan a la estructura secundaria de la lectina.

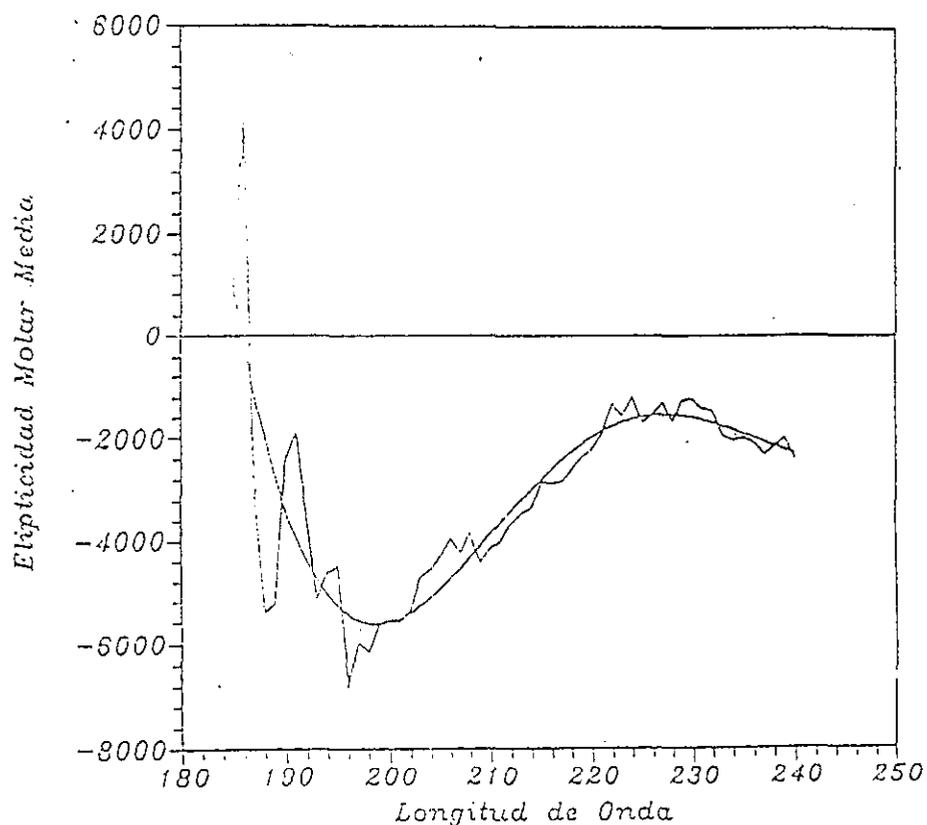


Figura. 11. Espectro de dicroísmo circular de la lectina *A. Leucocarpus*. Se observa que la lectina tiene un alto contenido de hojas β -plegada. La línea quebrada representa los datos obtenidos del espectropolarímetro y la línea continua representa el suavizado de los datos.

ESTUDIOS DE LA ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA DE *A. leucocarpus*.

Actividad hemaglutinante.

El extracto crudo y la lectina purificada poseen actividad hemaglutinante. El título de la actividad hemaglutinante de la lectina es semejante en presencia de eritrocitos humanos del sistema A,B,O, siendo 2 µg/ml la concentración mínima de lectina para aglutinar 2×10^6 células. El tratamiento con neuraminidasa y pronasa, incrementa hasta cinco veces la capacidad de los eritrocitos para ser aglutinados por la lectina (Tabla 10).

Tabla 10
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA DE *A. leucocarpus*
EN PRESENCIA DE ERITROCITOS HUMANOS.

ERITROCITOS			
TRATAMIENTO	A	B	O
Normales	64	64	64
Neuraminidasa.	256	256	256
Pronasa	256	256	256

El título hemaglutinante de la lectina en presencia de diferentes fenotipos sanguíneos no varía significativamente; sin embargo, cuando dichos fenotipos reciben tratamiento enzimático con neuraminidasa y pronasa, se observa un incremento de cinco veces para los eritrocitos tratados con pronasa y de cuatro veces con neuraminidasa en el título hemaglutinante en presencia de eritrocitos del fenotipo M, en comparación con los otros fenotipos probados (Tabla No. 11).

Tabla 11
ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA DE *A. leucocarpus* EN PRESENCIA DE ERITROCITOS HUMANOS DE DIFERENTES FENOTIPOS*

	Sin tratamiento	NANASA**	Pronasa	NANASA +Pronasa
Kell	2	64	64	128
Le ^a	2	64	64	128
Le ^b	2	64	64	128
M	2	128	256	1024
N	2	64	64	128
P	2	64	64	128
S	2	64	64	128

*La concentración de la lectina fue diluida hasta un título de aglutinación de 2 UHA

**NANASA neuraminidasa de *Vibrio cholerae* y Pronasa de *Streptomyces griseus*

ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA POR CARBOHIDRATOS.

Mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación de la lectina se demostró que la GalNac es el único monosacárido que inhibe la actividad hemaglutinante de la lectina, mientras que otros monosacáridos como la L-fucosa, D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, lactosa, D-galactosamina, D-manosamina y el ácido neuramínico, no modificaron la actividad hemaglutinante de la lectina (Tabla 12).

Tabla 12
INHIBICION DE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA LECTINA DE
A. leucocarpus* POR CARBOHIDRATOS

AZÚCAR	TITULO**
D-galactosa	32
D-glucosa	32
D-manosa	32
D-manosamina	32
L-fucosa	32
N-acetil-D-galactosamina	2
N - acetil-D-glucosamina	32
Ac.-N-acetil neuramínico	32
Control sin inhibidor	32

* A una concentración de 100 μ M en solución salina isotónica.

**Representado como el inverso de la última dilución con actividad hemaglutinante en presencia de eritrocitos humanos O con fenotipo M.

Especificidad de la lectina por glicoproteínas, glicopéptidos y glicanos.

De las diferentes glicoproteínas utilizadas, únicamente la fetuína, la mucina submaxilar bovina, la mucina submaxilar ovina y la IgA sérica humana inhibieron la actividad hemaglutinante de la lectina en concentraciones hasta 100 mil veces menores que la GalNac. Otras proteínas como la ovoalbúmina, el orosomucoide humano y la mucina estomacal porcina, no ejercen ningún efecto sobre la lectina hasta concentraciones de 100 μ M.

Los glicanos y los glicopéptidos liberados de las proteínas inhibidoras, no afectan

mucho la actividad hemaglutinante de la lectina. Resulta interesante observar que los glicanos de la mucina porcina liberados por hidrólisis alcalina inhiben la actividad hemaglutinante, aunque su potencial inhibitorio sea inferior a las glicoproteínas nativas como la fetuína y mucina submaxilar ovina y bovina. (Tabla 13).

Tabla 13
ESPECIFICIDAD DE LA LECTINA DE *A. leuocarpus* POR GLICOPROTEÍNAS, GLICOPÉPTIDOS Y GLICANOS.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (μ M)	POTENCIAL INHIBIDOR RELATIVO
GalNac	62	1
Fetuína.	0.005	12,4000
Mucina submaxilar bovina	0.05	1,240
Mucina submaxilar ovina	0.01	6,200
Asialo-fetuína	0.001	620,000
Asialogalacto-fetuína	0.002	310,000
IgA sérica humana	0.001	6,200
IgG	N.I	-
Asialoglicanos de fetuína	15	62
Glicanos de IgA	13	4.8
N-glicopéptidos de eritrocitos humanos A	N.I	-
N-glicopéptido de fetuína	N.I	-
Orosomucoide	N.I	-
Ovoalbumina	N.I	-
Mucina estomacal porcina	N.I	-
Oligosacárido I de mucina porcina	15	4.1
Oligosacárido II de mucina porcina	32	1.9
Oligosacárido III de mucina porcina	N.I	-

NI No inhibidor a una concentración de 100 μ M.

Efecto del pH en la interacción lectina -receptor.

La interacción de la lectina de *A. leucocarpus* con eritrocitos del fenotipo M o N es diferente, en ambos grupos celulares se requiere de una concentración de 80 mM de cloruro de sodio, mientras que la interacción lectina-eritrocito se produce a diferentes pH, identificándose que a pH 9 la actividad de la lectina disminuye de manera importante, sobre todo en presencia de eritrocitos humanos con el fenotipo M; mientras que en el fenotipo N a pH 9 no se aprecia una disminución significativa en el título hemaglutinante (Fig. 12)

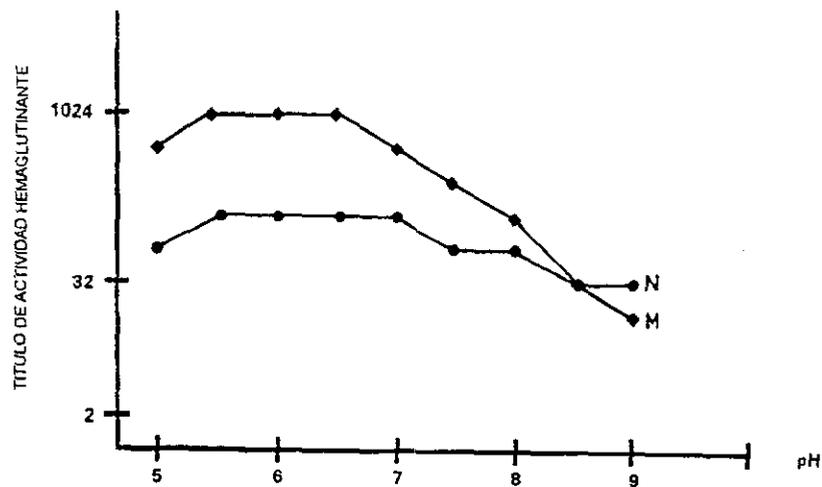


Figura 12. Efecto del pH en la interacción de la lectina con eritrocitos con fenotipos M y N. La concentración de la lectina fue de 2.4 $\mu\text{g/ml}$

DISCUSIÓN

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y cada día se reportan nuevas lectinas. En este ámbito, las lectinas vegetales son abundantes y las aisladas de las familias de gramíneas y de leguminosas han sido caracterizadas desde el punto de vista estructural y de su especificidad por carbohidratos, encontrándose semejanzas estructurales en las secuencias de aminoácidos y arreglos tridimensionales; sin embargo, existen diferencias importantes que hacen que las lectinas interactúen de forma muy precisa con las diferentes estructuras oligosacáridicas que reconocen. Esto permite interpretar las diferencias en cuanto a las actividades biológicas identificadas para diversas lectinas, aún cuando compartan la misma especificidad sacarídica.

La lectina aislada de la semilla del amaranto comparte la especificidad por carbohidratos con otras lectinas aisladas de la familia de las leguminosas; como la lectina de cacahuate (*Arachis hypogaea*), la cual también es específica para GalNac, reconoce poblaciones celulares de linfocitos T CD8, que son poblaciones de linfocitos T que tienen actividad citotóxica, mientras que la lectina de *A. Leucocarpus*, reconoce a linfocitos CD4, poblaciones de linfocitos T que ayudan en la respuesta inmunológica contra antígenos. Esto sugiere que los mecanismos de interacción de estas lectinas con el monosacárido GalNac son distintos y que son mediados posiblemente por la estructura tridimensional de las mismas. De igual forma, la similitud en cuanto a la especificidad también se ha identificado entre lectinas de la misma familia de amarantáceas, particularmente *A. Caudatus*; sin embargo, a diferencia de *A. Leucocarpus*, esta lectina no posee actividad mitogénica hacia linfocitos.⁵⁶

La purificación de la lectina ALL se realizó por cromatografía de afinidad utilizando

tres ligandos distintos; a) estroma de eritrocitos-Sephadex G-25, b) IGA-Sepharose y c) fetuina-Sepharose. En los tres casos se identificó una fracción que es eluida con ácido acético al 3% o mediante la adición de N-acetil-D-galactosamina y que posee actividad hemaglutinante. Nuestros resultados indican que los tres sistemas son adecuados para la purificación de la lectina, ya que la actividad específica se aumenta en los tres sistemas aproximadamente un 800% con respecto al extracto crudo.

Analizando las ventajas que tiene la utilización de los diferentes tipos de ligando, podemos considerar que la columna con estroma permite mayor rendimiento en la purificación que las columnas acopladas a fetuina e IgA; además, hay que considerar que el costo de estas últimas es elevado y que para la obtención de estroma se utiliza sangre que ha caducado en los bancos de sangre o aquella que proviene de pacientes policitémicos y que no será utilizada, aunque el proceso de elaboración de una columna de estroma es más largo en comparación con el método de acoplamiento por bromuro de cianógeno.

El análisis electroforético de la lectina purificada por los tres distintos sistemas de purificación, muestra una banda que corresponde a un peso de 35 kDa en condiciones desnaturalizantes, este peso molecular es muy parecido al que tienen otras lectinas de la familia de las amarantáceas como es el caso de *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus cruentus*, las cuales poseen un peso molecular de 33 kDa.

Los residuos de cisteína son raros en proteínas de origen vegetal, presentándose solamente en los cereales⁵⁷. La lectina de germen de trigo (WGA) posee enlaces disulfuros intracatenarios, los cuales ayudan a la conformación tridimensional de la lectina, sin embargo, dichos enlaces no participan en el sitio de unión de la lectina, pero son necesarios para mantener su estructura tridimensional. Considerando que el amaranto

pertenece a la familia de los pseudocereales, evaluamos la posible participación de estos residuos en el sitio de reconocimiento de la lectina. Nuestros resultados indican que la modificación mediante carboximetilación y succinilación disminuyen la actividad hemaglutinante de la lectina, lo que nos indica, que posiblemente los residuos de cisteína no se encuentran en el sitio activo de la lectina; sin embargo, la modificación química de estos residuos en la lectina posiblemente altere la conformación tridimensional y que esta desnaturalización provoca la pérdida de la actividad hemaglutinante.

Los glicopéptidos de la lectina de *A. leucocarpus*, obtenidos por tratamiento enzimático con pronasa, fueron purificados por cromatografía de afinidad utilizando a la lectina de Con A, la que posee afinidad por el enlace α 1-6 en el núcleo trimanosídico, otras lectinas como la LCA que reconoce estructuras oligomanosídicas sustituidas con L-fucosa y la de alubia, la cual posee especificidad por oligosacáridos Gal β 1-4GlcNac o Gal β 1-3GlcNac β 1-2Man presentes en bi o triantenarios N-glicopéptidos del tipo acetil-lactosamínico. La composición de carbohidratos de estos glicopéptidos revela un alto contenido en estructuras oligomanosídicas. Para evaluar la participación de la porción glicánica de la lectina, en su conformación utilizamos dos tratamientos, uno químico con periodato y el otro enzimático. Nuestros resultados nos muestran que la actividad hemaglutinante de la lectina va disminuyendo conforme avanza el tiempo de reacción con periodato, este efecto podría ser provocado por el tratamiento, ya que puede llegar a desnaturalizar a la proteína y por esta razón para confirmar que la eliminación de la porción sacarídica de la lectina provoca modificación de su función aglutinante, utilizamos un tratamiento enzimático más específico con la endoglicosidasa F, que reconoce estructuras del tipo oligomanosídico y el cual nos aseguraba que la parte protéica no sufriría

desnaturalización alguna; utilizando este tratamiento también se observó una disminución en la actividad hemaglutinante, lo que indica que los carbohidratos participan posiblemente, estabilizando la estructura tridimensional de la lectina. Este hallazgo resulta interesante ya que la lectina de *A. caudatus* no posee carbohidratos en su composición⁴³ y posee actividad hemaglutinante y un peso molecular muy parecido a la lectina de *A. leucocarpus* (33 vs 35 kDa). Este resultado además confirma los datos previos sobre la estructura de la porción glicánica de *A. leucocarpus*.

Mediante cromatofoco se determinó que el punto isoeléctrico de la lectina de *A. leucocarpus* está entre 4.8 y 5.4, lo cual podría sugerir la presencia de isoformas estructuralmente diferentes. Las isoformas no son raras en las lectinas de origen vegetal, así tenemos que en leguminosas se han aislado por lo menos tres isoformas en *Vicia villosa*, donde se ha observado incluso, que estas isoformas pueden tener distinta especificidad hacia carbohidratos. En el caso de *Phaseolus vulgaris* se han aislado cuatro isoformas que tienen diferentes actividades biológicas, ya sea de hemaglutinina o leucoaglutinina o de ambas según sea la isoforma. En el caso de los cereales en la lectina de germen de trigo se han aislado y caracterizado tres isoformas, las cuales poseen la misma especificidad; por tal razón se buscaron isoformas de la lectina mediante el uso de los sistemas FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) y cromatografía de alta resolución HPLC. Cuando se usó el HPLC, se logró obtener una fracción, mientras que con el FPLC, se obtuvieron dos fracciones de diferentes tamaños, la primera de ellas es la que tiene mayor actividad hemaglutinante y representa aproximadamente el 70% de la proteína inyectada, mientras que la segunda representa el 30% y tiene menor actividad hemaglutinante lo cual podría sugerir la presencia de por lo menos dos isoformas de la lectina.

La determinación de la estructura secundaria mediante el espectro de dicroísmo circular de la lectina, presenta un alto contenido de hojas plegadas beta en su estructura secundaria, este tipo de estructura es característico de algunas lectinas obtenidas de leguminosas, las que, al igual que el amaranto, presentan hasta el 60% de hojas plegadas beta, aunque existe la posibilidad de que las otras lectinas de este género presenten un tipo de estructura secundaria semejante. De la familia de los cereales, la lectina del germen del trigo presenta un espectro de dicroísmo circular, en el cual las hojas plegadas beta son escasas y esto se debe a la presencia de residuos de cisteína en su composición, por lo tanto, resulta interesante analizar las características que la lectina de amaranto pueda compartir con lectinas que pertenecen a las leguminosas y a lectinas que pertenecen a las gramíneas

La lectina *A. leucocarpus* aglutina eritrocitos del sistema A, B y O, los cuales poseen antígenos específicos, así el grupo sanguíneo A está determinado por una GalNac, mientras que el B por una galactosa y el O por fucosa, lo cual sugiere que *A. leucocarpus* reconoce otro tipo de estructuras oligosacarídicas en la membrana del eritrocito, diferente a los determinantes sanguíneos; por tal razón se evaluaron otros marcadores fenotípicos cuyas estructura oligosacarídica fuera conocida, descartándose aquellos fenotipos cuyo determinante fuera proteico. Nuestros resultados mostraron que el fenotipo M es el que presentó mayor título de aglutinación, este título aumentó cuando los eritrocitos recibieron un tratamiento con neuroaminidasa, la cual elimina el ácido siálico, lo que nos indica que este no participa en la interacción con la lectina; un aumento en el título hemaglutinante también se observó al tratar a los eritrocitos con pronasa, la cual al eliminar fragmentos proteicos expone sitios de unión que antes estaban ocultos. Para

verificar que los determinantes M y N no fueran eliminados con este tratamiento, se utilizaron anticuerpos anti M y anti N. En los eritrocitos se encuentra la glicoforina A, la cual está constituida por trece enlaces O- glicosídicos y tres enlaces N-glicosídicos, y presenta dos isoformas conocidas como los fenotipos M y N, cuya diferencia está dada por un pentapéptido en el amino terminal, en donde el fenotipo M presenta una serina y el N presenta una leucina; los dos fenotipos presentan tres residuos de treonina O-glicosilados que poseen el disacárido Gal β 1-3GalNac; así, nuestros resultados indican que la lectina de *A. leucocarpus* es específica para el fenotipo M.

De los monosacáridos analizados, la GalNac es el que mejor inhibe la actividad hemaglutinante de la lectina en presencia de cualquiera de los grupos de eritrocitos estudiados, mientras que la fetuína, la asialofetuína, la asialogalactofetuína, la mucina submaxilar bovina y ovina inhiben la actividad hemaglutinante de la lectina. En este punto es interesante señalar que el efecto inhibitorio disminuye cuando se utilizan glicanos y glicopéptidos de las glicoproteínas anteriormente señaladas. La fetuína es una glicoproteína que contiene en su estructura trece enlaces N-glicosídicos y tres enlaces O-glicosídicos. Cuando se compara el efecto inhibitorio de glicopéptidos de ambos tipos de estructura por separado, se observa que sólo los glicopéptidos O-glicosilados tienen efecto inhibitorio. La estructura del O-glicano de la fetuína es la siguiente: NeuAc α 2-3 o NeuAc. α 2-6 Gal β 1-3GalNac, mientras que la asialo fetuína carece del ácido siálico en posición terminal y solamente se encuentra constituida por el disacárido Gal β 1,3GalNac. Un caso interesante es que cuando se utiliza la mucina submaxilar ovina, la cual sólo presenta GalNac unida a serina o treonina, también se inhibe el efecto hemaglutinante de la lectina, lo cual sugiere que la lectina puede reconocer el entorno proteico; un resultado

que también nos sugiere lo anterior es el efecto del pH en la actividad hemaglutinante de los fenotipos M y N, donde la actividad disminuye cuando el pH es de 9 en el fenotipo M, lo cual indica que el residuo de serina podría intervenir en la interacción con la lectina, probablemente debido a una desprotonización del OH de la serina. El disacárido Gal β 1-3GalNac-Ser /Thr, posee una conformación topográfica en la que el hidróxilo axial del C4 de la galactosa, el grupo acetomido del C2 y el hidróxilo axial del C4 de la galactosamina interactúan con el sitio de reconocimiento de la lectina. Este tipo de interacción es semejante al observado en la lectina de *Amaranthus caudatus*; sin embargo, es probable que el entorno proteico participe en dicha interacción y de esta forma desencadene los efectos biológicos observados en la lectina de *A. leucocarpus* y que son diferentes a los que se observan en otras lectinas con la misma especificidad.

CONCLUSIONES

- 1.- Por el método de cromatografía de afinidad utilizando ligandos específicos, es posible purificar a la lectina de *A. leucocarpus*.
- 2.- La glicoproteína está formada por dos unidades monoméricas de 35 kDa, con un alto contenido de hojas plegadas beta en su estructura secundaria, con la porción glicánica participando posiblemente en la estabilización de la estructura tridimensional de la lectina.
- 3.- La lectina posee actividad hemaglutinante hacia los eritrocitos del sistema A,B y O, que poseen el fenotipo M.
- 4.- La actividad hemaglutinante es inhibida por el monosacárido GalNac y por el disacárido Gal β 1-3GalNac unido a serina o treonina, siendo esta interacción determinada por el hidróxilo axial en el C4 de la galactosa, el hidróxilo axial en el C4 y el grupo acetamido del C2 en posición ecuatorial de la N-acetilgalactosamina.
- 5.- La lectina de *Amaranthus leucocarpus* puede ser una herramienta en la identificación de poblaciones celulares y grupos sanguíneos.

PERSPECTIVAS

- 1.- Obtener la secuencia de aminoácidos de la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.
- 2.- Evaluar la participación de la porción proteica de glicoproteínas O-glicosiladas en la interacción con la lectina de *Amaranthus leucocarpus*.
- 3.- Obtener la estructura tridimensional de la lectina de *Amaranthus leucocarpus* mediante el crecimiento de cristales.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M, Osawa T and Sharon N (1980). What should be called a lectin? *Nature* 285-286.
2. - Nowel P C (1960). Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res* 20: 462-466.
- 3.- Nesser R, Koellreutter B and Wuersch P (1986). Oligomanoside type glycopéptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili. Preparation of potent inhibitors from plant glycopéptides. *Infec. Immun.* 58: 428-436
- 4.- Sharon N and Lis H (1986) Bacterial lectins. In: *The Lectins Properties, Function and Application in Biology and Medicine.* Academic Press. 266-270.
- 5.- Lis H and Sharon N (1986) Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 35-67.
- 6.- Metzler E (1977). *The chemical reactions of living cells.* Academic Press. 281-282
- 7.- Ofek I, Mirelman D and Sharon N (1977) Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by manose receptors. *Nature.* 265: 623-625.
- 8.- Ofek I and Sharon N (1988). Lectinophagocytosis, a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectin in phagocytosis of bacteria. *Infec. Immun.* 56: 539-547.
- 9.- Barondes S H (1981) Lectins: Their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 207-231
- 10.- Strocker R J, Morell A, G and Schemberg H (1974). Animal hepatic lectins. *Science* 186: 365-366
- 11.- Lis H and Sharon N (1978) Lectins: Their chemistry and application to immunology. In: *The Antigens. Vol. IV Cap. 7.* Academic Press. págs. 429-459
- 12.- Sharon N. (1984) Surface carbohydrates and surface lectins are recognition determinants in phagocytosis. *Immunol. Today* 5: 1-5
- 13.- Gallily R, Vray B, Stain Y and Sharon N (1984). Wheat germ agglutinin potentiates uptake of bacteria by murine peritoneal macrophages. *Immunology* 52: 679-686.

- 14.- Barondes S H (1988). Soluble lectins: A new class of extracellular proteins Science. 223: 1259-1264
- 15.- Skider S E, Kabat E A, Steer C J and Ashwell G (1983). Binding of synthetic oligosaccharides to hepatic Gal / GalNac lectin. Dependence of fine structural features. J.Biol. Chem 258: 199-202.
- 16.- Shanker P N, Wilkinson K D, Goldstein I (1976). An N-acetylglucosamine binding lectin from *Bandeirea simplicifolia* seeds. J. Arch. Biochem. Biophys. 177: 330-333
- 17.- Sharon N (1977) Lectins. Sci. Amer. 136: 108-119.
- 18.- Mákela O (1957). Studies on hemagglutinins of leguminoseae seeds. Ann. Med. Exp. Fenn. Supl. 11: 1-156
- 19.- Pereira M E, Kabat E A and Sharon N (1974). Immunochemical studies on the specificity of soybean agglutinin. Carbo. Res. 37: 89-102
- 20.- Hui Y and Thomas H (1993). Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacaling isolectins. J. Biol. Chem. 268: 5905-5910
- 21.- Danny J Schell and Marilyn E (1988). cDNA cloning, primary structure and in vitro biosynthesis of DB58 lectin from *Dolichos biflorus*. J. Biol. Chem. 263: 14648-14653.
- 22.- Schiltz E and Ruder H (1981). The amino-acid sequence of the alfa subunit of mitogenic lectin from *Vicia sativa*. Eur. J. Biochem. 113: 319-325
- 23.- Sharon N and Halina L (1990) Legume lectins, a large family of homologous proteins. FASEB J. 4: 3198-3208
- 24.- Foirest A, Lebrum E, Van Repebusch R, De Neve R and Dony S (1981). The structure of lentil (*Lens culinaris*) lectin aminoacid sequence and predictions secondary structure.
- 25.- Yarwood A, Richarson M, Sousa-Cavada R and Rouge P (1985). The complete aminoacid sequence of β_1 and β_2 subunits of isolectins Lol I and Lol II from seeds of *Lothyrus adrus* FEBS. Lett. 104: 104-109.
- 26.- Adar R, Richardson R, Lis H and Sharon N (1989). The amino acid sequence of the *Erythrina corallodendrum* lectin and its homology with other legume lectins. FEBS. Lett. 237: 81-89
- 27.- Imbri Milligan C, Data P and Goldstien L J (1989) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the lima bean lectin. J.Biol. Chem. 264: 16793-16797.

- 28.- Komani Y, Yamamoto and Osaka T (1990). The primary structure of the *lotus tetragonobulus* lectin. FEBS. Lett.. 268: 281-286.
- 29.- Wei S, Zhi Sh, Ce S and Jen Y (1993). Conformation and activity of *Phaseolus coccimus*. Var.*Rubronanus* lectin. J. Prot. Chem. 12:153-157
- 30.- Ivano B, Maria S, Claudio L, Emille E and Fred B (1987).Circular dichroism and ¹HNMR of Co ²⁺ and Ni ²⁺ substituted Concanavaline A and the lentil and pea lectins. J. Biol. Chem. 282: 16985-16994.
- 31.- Rang Qi, Wei S, Zhi S and Ce S (1994). A mannose-specific lectin from *Vicia villosa* seeds. Biochem. Biophys. Act. 1201: 61-68.
- 32.-Thomas W, Mimb H, Freddy M and Reny L (1996). The Crystallographic structure of phytohemmaglutinin-L J.Biol. Chem. 34: 20479-20485.
- 33.- Einspahr H, Parks E, Suguna H and Suddanth F. (1986). The crystal structure of pea lectin at 3.0 | resolution. J. Biol. Chem. 261: 16518-16527.
- 34.- Lorris R, Steyaert J, Maes D, Liggartem J and Wyns L (1993). Cristal structure determination and refinement a 2.3 | of lentil lectin. Biochemistry 32: 8773-8781
- 35.- Bourne Y, Rousell A, Rougé P, Fontanilla C and Cambillian C. (1990) Protein 7: 365-376
- 36.- Banerjee R, Das K, Ravishankar R, Suguna K, Surolia A and Vijayan M (1996) Conformation, protein-carbohydrate interaction and novel subunit association in the refined structure of Peanut lectin-lactose complex. J. Mol. Biol. 259: 281-296.
- 37- Delhaer L, Vandeseleur M, Prossad L, Quial W, Smilie L, and Lamieux R. (1990) Curr. J. Chem 48: 1118-1121.
- 38.- Shanahan B, Lis H and Sharon N (1991) Science 254: 862-866
- 39.- Weiss I and Drickramer K (1996) Structural basis of the lectin-carbohydrate recognition. Annu. Rev. Biochem. 65: 441-473
- 40.- Rini M (1995) Lectin structure. Annu. Rev. Biomol. Struc. 24: 551-577.
- 41.- Sánchez-Marroquín A (1980). Potencialidad industrial del amaranto. CEESTEN. México D.F.
- 42.- Bourges H.(1990) Perfil bromatológico del amaranto. Primer Seminario Nacional del Amaranto. Compiladores Santos A, Gómez F y Suárez G Chapingo México p. 577

- 43.-Rinderle S J, Goldstein J and Reseen E. (1990). Physicochemical properties of Amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds. *Biochemistry*. 29: 10555-10561
- 44.- Calderón de la Barca and Vázquez-Moreno L. (1988) *Amaranthus cruentus* lectin: Purification, stability and some biochemical properties. *J. Food. Biochem.* 12: 117-126.
- 45.- Zenteno E, Ochoa L, Parra C, Montaña L, Rayón I, Maldonado G, Ruiz B, Carbajal R. (1985) Mitogenic immunosuppressive and phagocytic activity of *Macharocerus eruca* and *Amaranthus leucocarpus* lectin. In *Lectins-biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Bög-Hansen TC Breborowicz J, eds Walter de Gruyter. 4: 537-546.
- 46.-Lascurain R, Chávez R, Gorocica P, Pérez A, Montaña L.F, and Zenteno E. (1994) Recognition of CD4⁺ mouse medullary thymocyte subpopulation by *Amranthus leucocarpus* lectin. *Immunology*. 83: 410-13
- 47.- Zenteno E and Ochoa J. (1988) Isolation and characterization of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Phytochemistry* 27: 313-317.
- 48.- Dodge T, Mitchell C and Hanahan D (1963) *Arch. Biochem. Biophys* 100-113
- 49.- March C, Parkib I and Cuatrecasas P (1974). *Anal Biochem.* 60: 149-152.
- 50.- Bradford M.M.(1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* 37:157-223.
- 51.- Bidilngmeyer A, Cohen A and Tarvin L. (1984). A rapid analysis of amino acid using pre-column derivation. *J. Cromatogr.* 336: 93-104.
- 52.- Zanetta P, Breckenridge W and Vincendon G (1972). Analysis of monossacharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glycosids as trifluoroacetates derivates. Applications to glycoproteins and glycolipids. *J. Cromatogr.* 69: 291-304
- 53.- Fontana A and Erhard G (1986). Fragmentation of polipeptides by chemical methods. In *practical Protein Chemistry. A Hand Book* págs. 68-95.
- 54.- Holecker M (1980). Counting integral numbers of residues by chemical nodification. *Proteins structure. A practical approach.* Págs. 145-153.
- 55.- Plummer H, Tarantino.L. (1991). Purification of oligossacharide-cleaving enzymes of *flavobacterium meningosepticum*. *Glicobiology.* 1: 257-263
- 56.-Pardoe L, Bird G, Sprenger I, Heggen M (1970). *Inmunotaesforsch. Allerg. Klin. Immunol* 140. 374-98.

57.- Puztai A (1991) Plant Lectins. Cambridge University Press. Cambridge U.K págs: 32-38.

58.- Pérez E, Lascurain R, Sierra C, Espinosa B, Debray H, Bouquelet S and Zenteno E.(1997). Erythroagglutinin from *Phaseolus coccimus* Var. Alubia: Chemical Characterization , sugar specificity and effect on blood coagulation factors. J. Agric. Food Chem.45: 3747-3752.