



Producción y aplicaciones de la lectina de ceibo (*Erythrina cristagalli*)

**Tesina correspondiente a la Licenciatura en
Bioquímica**

William Bautista

**Tutora: Dra. Laura Franco Fraguas
Cátedra de Bioquímica
Facultad de Química**

Marzo 2013

INDICE

Indice de contenido

RESUMEN.....	4
OBJETIVOS.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Clasificación de lectinas vegetales y propiedades fisicoquímicas.....	8
1.2. Naturaleza de la interacción lectina – carbohidrato.....	14
1.3. Evaluación de la interacción de lectina – carbohidrato.....	15
1.4. Funciones biológicas de lectinas vegetales.....	20
1.5. Aplicaciones de lectinas vegetales.....	21
1.5.1. Aplicaciones de las lectinas inmovilizadas.....	23
1.6. Lectina de ceibo (<i>Erythrina cristagalli</i>).....	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2.1. Material vegetal.....	28
2.2. Aislamiento y purificación de la lectina de <i>Erythrina cristagalli</i> (ECL) por cromatografía de afinidad.....	28
2.2.1. Preparación de los extractos de <i>Erythrina cristagalli</i>	28
2.2.2. Purificación de ECL por cromatografía de afinidad.....	29
2.3. Síntesis del adsorbente ECL-Sepharosa 4B.....	29
2.3.1. Activación del soporte Sepharosa 4B con reactivo CDAP.....	29
2.3.2. Inmovilización de ECL en Sepharosa activada.....	30
2.3.3. Cromatografía de afinidad de glicoproteínas modelo en ECL-Sepharosa.....	30
2.4. Análisis.....	31
2.4.1. Determinación de proteínas soluble e inmovilizada.....	31
2.4.2. Análisis electroforético.....	31

2.4.3. Ensayo de hemaglutinación (HAG).....	32
2.4.3.1. Inhibición de HAG mediante carbohidratos.....	32
2.4.3.2. Efecto del EDTA en la HAG.....	33
2.4.4. Análisis espectrofotométrico de ECL.....	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1. Extracción y purificación de la lectina de <i>Erythrina cristagalli</i> var. <i>hasskarlii</i> Backer (ECL- hB).....	34
3.1.1. Primera variante de purificación de ECL-hB (E1).....	35
3.1.2. Segunda variante de purificación de ECL-hB (E2).....	43
3.1.3. Tercera variante de purificación de ECL-hB (E3).....	46
3.2. Extracción, purificación y caracterización de la lectina <i>Erythrina cristagalli</i> var. <i>leucochlora</i> Lombardo (ECL-L).....	47
3.3. Inmovilización de ECL-hB.....	56
3.4. Interacción entre ECL-hB-Sepharosa y glicoproteínas modelo.....	57
4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	60
5. APENDICE.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	63
AGRADECIMIENTOS.....	68

Se aislaron dos lectinas a partir de harinas obtenidas de semillas de *Erythrina cristagalli* variedades *hasskarlii* Backer (EC-hB) y *leucochlora* Lombardo (EC-IL). La purificación de ambas lectinas se realizó en columna de afinidad de galactosil-Sepharosa y en el caso de la lectina de EC-hB (ECL-hB) se obtuvieron 4.8 mg de material purificado a partir de 20 g de harina deslipidizada. La ECL-IL tiene afinidad específica para galactosa y sus derivados. Se inmovilizó ECL-hB sobre Sepharosa 4B utilizando método de activación con reactivo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP). El proceso de inmovilización utilizado permitió obtener un adsorbente con una densidad de ligando de 0,24 mg de lectina/g de gel sedimentado y un rendimiento de inmovilización de 49 %. Se evaluaron los comportamientos cromatográficos de 3 glicoproteínas modelo en columna de ECL-hB-Sepharosa: fetuína de suero fetal bovino, asialofetuína y ovalbúmina, observándose un comportamiento claramente diferencial entre fetuína (5% de adsorción) y asialofetuína (23% de adsorción) mostrando la importancia que juega el ácido siálico terminal en el proceso de reconocimiento lectina-glicoproteína.

Palabras claves: *Erythrina cristagalli* – Lectinas – hemaglutinación – Glicoproteínas – cromatografía de afinidad.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Aislar, purificar y buscar potenciales aplicaciones de la lectina de ceibo - *Erythrina cristagalli*, variedades *hasskarlii* Backer (ECL-hB) y *leucochlora* Lombardo (ECL-lL).

Objetivos específicos:

1. Aislar y purificar la lectina a partir de semillas de ceibo rojo (EC-hB) colectadas en nuestro país.
2. Evaluar la presencia de la lectina en extractos de semillas de ceibo blanco (EC-1L) colectadas en nuestro país.
3. Inmovilizar covalentemente la ECL-hB a soporte de tipo agarosa.
4. Estudio del comportamiento cromatográfico de glicoproteínas modelo frente al adsorbente ECL-hB-Sepharosa.

1. INTRODUCCION

El término lectina viene del latín “legere” que significa elegir, para referirse a un grupo de proteínas con la habilidad de aglutinar células, presentes en semillas de plantas, algunas de las cuales eran específicas para ciertos grupos sanguíneos (Boyd & Shapleigh, 1954a, b). Posteriormente, las lectinas fueron definidas como “proteínas o glicoproteínas que unen carbohidratos y de origen no inmune, que aglutinan células y/o precipitan polisacáridos y glicoconjugados” (Goldstein *et al.*, 1980). Más recientemente se las ha definido como proteínas modulares que tienen por lo menos un dominio de unión a carbohidratos y que presentan en ocasiones, otros dominios proteicos en la estructura (Peumans & Van Damme, 1995; Gabius, 1997). La definición actualmente más generalizada, las identifica como “proteínas que poseen al menos un dominio con un sitio de unión a carbohidratos a través del cual interaccionan específica y reversiblemente con glicocompuestos” (Van Damme *et al.*, 1998).

Una propiedad remarcable de las lectinas es su capacidad de aglutinar células, debido a la presencia de múltiples sitios de unión a carbohidratos en la molécula, de ahí que comúnmente se las denomine aglutininas, hemaglutininas ó fitohemaglutininas (Rüdiger & Rougé, 1998). Esta multivalencia explica también la habilidad de algunas lectinas de precipitar glicoconjugados.

Las lectinas varían en tamaño, composición aminoacídica, organización de los dominios, metales que la componen, número de subunidades, forma en que se ensamblan, estructura tridimensional y en los sitios de unión. Se encuentran en todos los organismos vivos: animales vertebrados o invertebrados, virus, bacterias, protozoarios, hongos y plantas (Sharon & Lis, 2007).

En el caso de lectinas vegetales, su localización está también variada, encontrándose principalmente en órganos de almacenamiento, semillas, tubérculos ó bulbos. En el caso de semillas de plantas pertenecientes a la familia Leguminosae, generalmente se encuentran en los cotiledones y en porcentajes que pueden llegar hasta el 10% del total de proteínas

(Rüdiger & Rouge, 1998). En esta familia, las lectinas pueden presentarse como una combinación de varias isoformas a las que se las denomina *isolectinas*, las cuales son producto de polimorfismo genético, ó de modificaciones postraduccionales (como el clivaje de alguna cadena de oligosacáridos, ó de deglicosilación total o parcial ó del diferente ensamblado de las subunidades que la componen (Sharon & Lis, 2007). Muchas isolectinas presentan por ejemplo, carga eléctrica diferente lo que hace posible que se puedan separar por cromatografía de intercambio iónico ó mediante isoelectroenfoque. Un ejemplo lo constituye la aglutinina de soja (*Glycine max*) en la que se han caracterizado ocho isolectinas por isoelectroenfoque (Sharon & Lis, 2007).

Las lectinas interaccionan con los carbohidratos tanto en forma de monosacáridos como cuando forman parte de oligosacáridos complejos y este reconocimiento por estructuras oligosacarídicas más complejas puede ser hacia el monosacárido en posición terminal ó intermedia.

Dada la diversidad que presentan las lectinas provenientes de diferentes orígenes, en este trabajo sólo nos limitaremos a describir propiedades y aplicaciones referidas a lectinas de origen vegetal y se hará especial énfasis en las lectinas pertenecientes a la familia Leguminosae.

1.1. Clasificación de lectinas vegetales y propiedades fisicoquímicas

Una de las primeras clasificaciones agrupó a las lectinas en cuatro clases, según la configuración de los carbonos C_3 y C_4 del anillo de hexapiranos (Fig. 1) (Mäkelä, 1957).

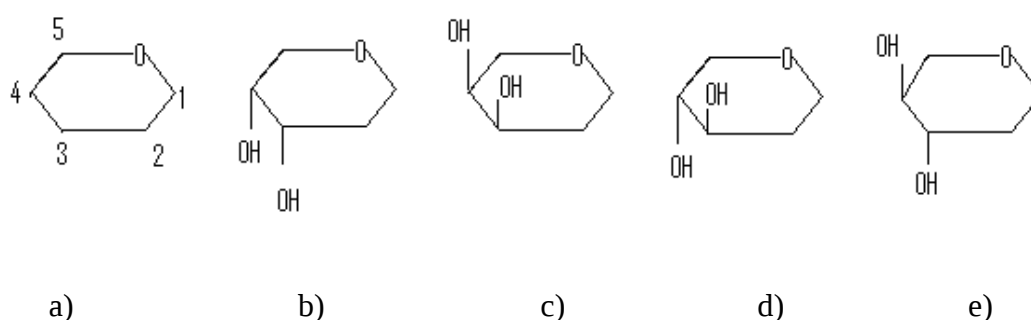


Figura 1. Numeración de los carbonos en el anillo hexapiranos y variación del grupo hidroxilo en el carbono C_3 y C_4 . (Extraído de Hernández Cruz *et al.*, 2005).

Una clasificación más reciente agrupa a las lectinas en cinco grupos, de acuerdo a su especificidad por el monosacárido (Manoj & Suguna, 2001):

- 1) Manosa / Glucosa (Man/Glc)
- 2) Galactosa/N-Acetil-D-galactosamina (Gal/Gal-NAc)
- 3) N-Acetil-D-glucosamina (GlcNAc)
- 4) Fucosa (Fuc)
- 5) Ácido siálico (en particular, ácido N-Acetilneuramínico).

A la especificidad por alguno de estos grupos de lectinas se le llama “especificidad primaria” (Sharon & Lis, 2007). Se ha demostrado que muchas lectinas tienen especificidad amplia, uniéndose o reconociendo a varios monosacáridos, aunque con diferente afinidad

(Sharon& Lis, 2007). Las lectinas que se unen a Gal también reconocen GalNAc, tolerando así la sustitución de un grupo funcional en el C₂ del anillo hexapiranos, lo que justifica la clasificación de estas lectinas en un solo grupo (Sharon& Lis, 2007).

Dentro de una misma familia, las lectinas vegetales pueden clasificarse, además de por la especificidad por un monosacárido, también por la especificidad por un oligosacárido, en donde estas últimas se diferencian en las que reconocen oligosacáridos de tipo *N*-glicano (donde un residuo de N-Acetil-D-glucosamina se une covalentemente a un residuo de asparragina de la proteína) y en las que reconocen oligosacáridos de tipo *O*-glicano (un residuo de N-Acetil-D-galactosamina se une covalentemente a un residuo de serina o de treonina de la proteína) (Fig.1.1) (Hernández Cruz *et al.*, 2005; Gallego del Sol *et al.*, 2006).

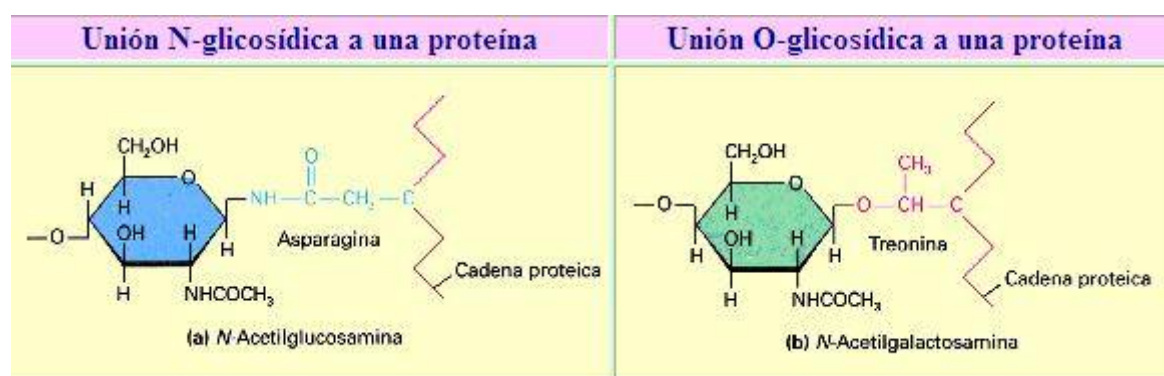


Figura 1.1. Uniones *N*- y *O*- glicosídicas presentes en glicoproteínas (Extraído de Mathews *et al.* 2002).

Se ha reportado que las lectinas de leguminosas, independientemente de su afinidad hacia determinado carbohidrato, tienen todas en su sitio de reconocimiento al mismo, tres aminoácidos comunes: asparragina, ácido aspártico y un aminoácido aromático o una leucina, donde la asparragina y el ácido aspártico participan en la coordinación, por ejemplo, del Ca²⁺ (Lis & Sharon, 1998; Hernández Cruz *et al.*, 2005). También se ha observado que en estas lectinas los residuos de Phe 6 y Phe 11 son conservados (Sharon& Lis, 2007).

Se ha visto además, que las secuencias aminoacídicas deducidas a partir las secuencias de

genes son homólogas entre lectinas de leguminosas aún con especificidades diferentes, lo que sugiere que estas lectinas están altamente conservadas dentro de la familia (Sharon & Lis, 2007).

Las técnicas de cristalografía de rayos X han permitido también una clasificación aún más precisa según la estructura de las lectinas de origen vegetal, agrupándolas en los siguientes siete grupos, y cuyas estructuras se muestran en la Figura 2 (Gallego del Solet *al.*, 2006; Van Damme, 1998):

Grupo 1: Lectinas de las leguminosas, formada por dímeros, trímeros o tetrameros de subunidades idénticas con un peso molecular alrededor de 30 kDa, donde cada subunidad tiene un sitio de unión a carbohidrato los que contienen iones metálicos como Mg^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+} y están formadas por doce hojas β antiparalelas unidas la unas con las otras dando origen a la formación de bucles.

Grupo 2: Lectinas específicas hacia quitina, las que tienen dominios de tipo heveína. Estas tienen dos subunidades iguales con una abundante presencia de residuos de cisteína en ellas, donde cada subunidad tiene cuatro puentes disulfuro correspondiente a cuatro dominios tipo heveína y cada dominio presenta un sitio de unión a carbohidrato, con la ausencia de iones metálicos. Se ha visto la presencia de una hélice α pequeña siendo la única estructura secundaria presente en este tipo de lectina.

Grupo 3: Lectinas de monocotiledóneas, que interaccionan con manosa. Son tetraméricas, donde cada subunidad es de aproximadamente 12 kDa y tienen una secuencia de treinta y seis aminoácidos repetidos tres veces. Su sitio de unión a manosa tiene cuatro hojas β antiparalelas.

Grupo 4: Lectinas con forma de prisma β o del tipo de estructura de la jacalina. Son tetrameros glicosilados y cada uno de ellos tiene una cadena pesada α y una cadena ligera β y además tiene tres hojas β antiparalelas.

Grupo 5: Lectinas que inactivan ribosomas. Tienen dos cadenas unidas por puente disulfuro. Una cadena tiene actividad N-glicosidasa sobre el ribosoma inhibiendo la traducción. La otra cadena tiene dos dominios con cuatro subunidades que tienen hélices α y hojas β .

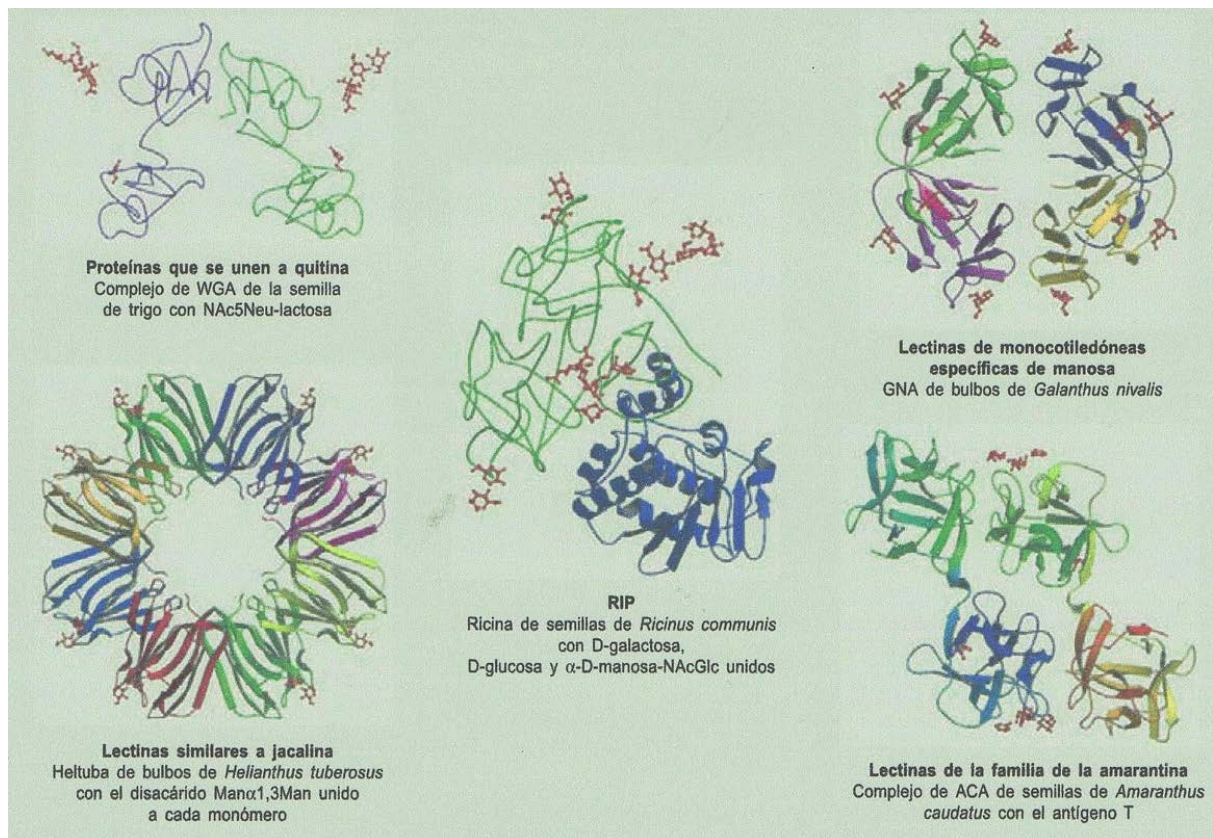


Figura 2. Representación de diferentes tipos de lectinas vegetales según su estructura cristalográfica. WGA: Aglutinina de germen de trigo (del inglés Wheat germ agglutinin); RIP: Proteína inactivadora de ribosomas (del inglés Ribosome inactivating proteins); GNA: Aglutinina de *Galanthus nivalis* (del inglés *Galanthus nivalis* agglutinin); ACA: Aglutinina de *caudatus* agglutinin (del inglés *Amaranthus caudatus* agglutinin). (Extraído de Gallego del Sol *et al.*, 2006).

Grupo 6: Lectinas del tipo amaranto. Consisten en dos monómeros con dos dominios unidos por una pequeña hélice donde cada uno de estos dominios tiene una conformación similar al trébol β .

Grupo 7: Lectinas del floema de cucurbitáceas. Son lectinas diméricas de unión a quitina. A pesar de la especificidad hacia quitina, no se encuentran dentro del grupo de las lectinas específicas de quitina (grupo 2) ya que no tienen homología alguna en la secuencia nucleotídica de los dominios de unión a quitina.

Existe una clasificación alternativa a la dada anteriormente para lectinas de plantas, basada en la estructura de los dominios que tienen cada una de las lectinas. De acuerdo a ello, se las clasifica en cuatro tipos (Peumans & Van Damme, 1995) y se las representa esquemáticamente en la Fig.3:

- a) Merolectinas: formadas estructuralmente por un único dominio que tiene un solo sitio de unión a carbohidrato. Debido a ello no son capaces de aglutinar células, por lo que no se las detecta mediante ensayo de hemaglutinación (HAG) ni tampoco precipitan glicoconjugados. La heveína es una lectina aislada del árbol del caucho *Hevea brasiliensis* y es una típica merolectina.
- b) Hololectinas: están formadas estructuralmente por dos o más dominios, los cuales son idénticos u homólogos. La mayoría de las lectinas de plantas pertenecen a este grupo.
- c) Quimerolectinas: son una fusión de dos ó más dominios de unión a carbohidratos unidos en *tandem* a otro dominio no relacionado, el cual puede tener una actividad enzimática definida ó una actividad biológica independiente del dominio de unión a carbohidratos.
- d) Superlectinas: estas son un caso particular de los quimerolectinas y están compuestas por un arreglo en *tandem* de dos dominios de unión a carbohidratos que son estructural y funcionalmente diferentes.

Merolectinas

Hololectinas

Quimerolectinas

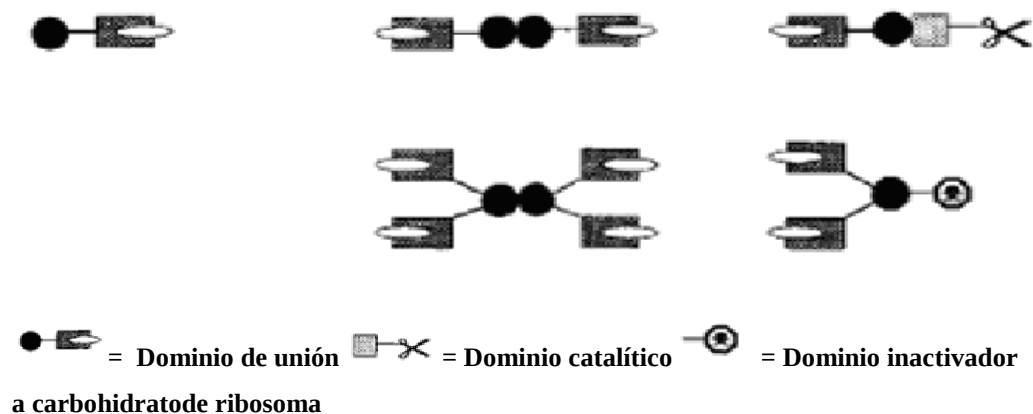


Figura 3. Representación esquemática de lectinas basada en sus estructuras principales: merolectinas, hololectinas y quimerolectinas (Extraído de Peumans & Van Damme, 1995).

Se ha determinado por métodos computacionales que las lectinas de leguminosas comparten una estructura tridimensional y de plegamiento común (Sharon & Lis, 2007), poseen la característica de tener en su estructura terciaria un pliegue con topología tipo “jelly-roll”, también llamado “pliegue” de lectina (Manoj & Suguna, 2001). Existe una región mínima determinante en el pliegue que tiene un andamiaje estructural que permite mayor flexibilidad y mayor adaptabilidad al momento de unirse al carbohidrato (Chandra *et al.*, 2001) y se ha visto además, que el sitio de unión al carbohidrato está organizado en cuatro bucles (Manoj & Suguna, 2001).

1.2. Naturaleza de la interacción lectina-carbohidrato

La selectividad en la interacción lectina-carbohidrato es debida a la interacción estereoquímica y específica entre moléculas complementarias. Las lectinas se unen a sus ligandos principalmente por enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, aunque en algunos casos ocurren interacciones electrostáticas y también de coordinación con iones metálicos (Sharon & Lis, 1989; Sharon, 2006).

Los enlaces de hidrógenos le dan especificidad a la interacción de la lectina con el carbohidrato. Estos enlaces involucran interacciones entre los grupos hidroxilo del carbohidrato y los aminoácidos de las cadenas laterales de la proteína, siendo los más comunes los residuos de aspártico, asparagina, glutámico, glutamina, arginina y serina. El hidroxilo del carbohidrato interacciona con la lectina por tener pares de electrones desapareados siendo tanto un donador como un aceptor de electrones (Sharon, 2006). El hidroxilo, como donador de electrones, tiene la ventaja de tener libertad de rotación sobre el ángulo formado por el C-OH permitiendo una mejor interacción con el grupo aceptor de electrones lo que es responsable de la especificidad (Sharon, 2006). Dos hidroxilos adyacentes en la molécula del carbohidrato y ambos interaccionando con residuos de aminoácidos de la proteína, pueden formar enlaces de hidrógeno bidentados. Existe un enlace de hidrógeno muy particular entre la lectina y el carbohidrato, y es el enlace cooperativo. En este enlace el grupo hidroxilo actúa simultáneamente como dador y aceptor de electrones (Sharon, 2006).

Los carbohidratos son moléculas polares o hidrofílicas, donde la disposición estérica de los grupos hidroxilo les permite crear contactos con cadenas hidrofóbicas de un aminoácido de la proteína, debido a las cargas parcialmente positivas en los protones alifáticos en el anillo de hexapiranososa y a una carga parcialmente negativa por los electrones π , en el anillo aromático. Los grupos metilos de carbohidratos acetoaminados interactúan con los residuos aromáticos de las lectinas (Bourne, 1992; Sharon, 2006). También se ha reportado contactos hidrofóbicos entre aminoácidos alifáticos como valina o leucina (Sharon, 2006).

En general los carbohidratos no tienen carga y por tanto no se dan interacciones tipo carga-carga con otras especies, pero existen lectinas que contienen iones metálicos como Ca^{2+} los que forman enlaces coordinados con grupos hidroxilos de los carbohidratos (Weiset *al.*, 1992).

El proceso de interacción lectina-carbohidrato implica el encuentro entre el sitio de unión de la lectina solvatado y el carbohidrato solvatado, formando así el complejo lectina-carbohidrato. Aquí los enlaces de hidrógeno que existen entre la lectina y la molécula de agua del medio y entre el carbohidrato y el agua, son remplazados por enlaces lectina-carbohidrato donde el agua queda libre y regresa al seno del solvente. El complejo formado tiene ahora una nueva superficie de hidratación por el medio (Sharon, 2006).

1.3. Evaluación de la interacción de lectina – carbohidrato

La especificidad y complementariedad de la unión de la lectina a carbohidrato es determinada en general por la técnica de inhibición de haptenos de Landsteiner. Esta técnica se basa en la reacción de precipitación entre la lectina y polisacáridos ó glicoproteínas, ó en la reacción de hemaglutinación (Sharon & Lis, 2007). Los monosacáridos pueden estar formando parte de glicoconjugados presentes en la superficie de los diferentes tipos de células, entre ellas en la superficie de los eritrocitos, y en ello se basa el test de hemaglutinación (HAG).

Otros métodos que se pueden usar para determinar la especificidad de la lectina incluyen: diálisis de equilibrio, espectroscopia UV-VIS, espectroscopia de fluorescencia, entre otros (Sharon & Lis, 2007).

Por lejos, la aglutinación de células es la forma más sencilla y utilizada para evidenciar la presencia de lectinas en un extracto y es lo que se conoce como ensayo de aglutinación. Para que se produzca aglutinación entre células y lectinas, se tienen que formar múltiples puentes cruzados entre las células y las lectinas, aunque no hay una relación clara entre la cantidad de lectina unida a la célula y la aglutinación (Fig.4). Así mismo, el número y la accesibilidad de los carbohidratos en la superficie y el estado metabólico de las células afectan la aglutinación (Sharon & Lis, 2007).

La HAG está condicionada por otros factores externos como la concentración celular, la temperatura, la vida media de las células, entre otros.

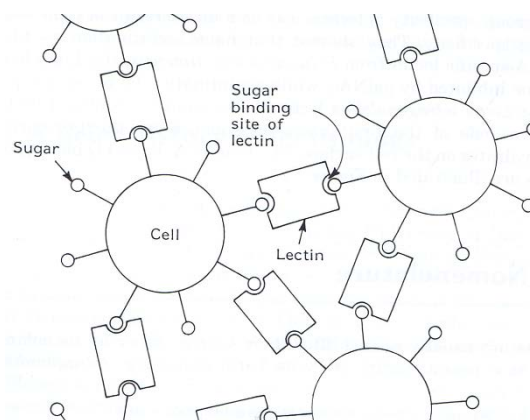


Figura 4. Diagrama de la aglutinación celular mediada por lectinas en donde una lectina con dos sitios de unión acarbohidratos conecta la superficie de dos células. Sugar: que significa azúcar en inglés; Cell: que significa célula en inglés; Lectin: que significa lectina en inglés; Sugar binding site of lectin: que significa sitio de unión de la lectina en inglés (Extraído de Brooks *et al.*, 1997).

Como forma de aumentar la sensibilidad del ensayo de HAG, se pueden pre-tratar los glóbulos rojos por ejemplo con proteasas, como la tripsina o con sialidasas, ello permite dejar más expuestos los carbohidratos en la superficie de las células y así ser más exitosa la aglutinación de células sin cambiar el número de moléculas de lectinas que van a ser unidas a la superficie de las células. También se pueden tratar las células con el reactivo glutaraldehído. La función de dicho reactivo es la de fortalecer la membrana de los eritrocitos, evitando la ruptura de membrana de los mismos. De esta forma, se aumenta la sensibilidad del ensayo de aglutinación (Sharon & Lis, 2007).

La inhibición por carbohidratos (simples o complejos) de la aglutinación mediada por lectinas, es lo que se conoce como ensayo de inhibición de la HAG y se usa para determinar

la especificidad de la lectina. Es la metodología de elección, cuando se comienza a trabajar en el aislamiento y purificación de nuevas lectinas.

Como se mencionó, existen además otras metodologías para estudiar las interacciones lectina-carbohidrato. A continuación se enumeran algunas de ellas:

i) Microarreglos (Microarrays) de lectinas: son una herramienta en la que un panel de lectinas, generalmente vegetales, son inmovilizadas sobre un chip y usadas para el análisis de reconocimiento de glicoproteínas. Existen variantes en los microarreglos de lectinas.

Una variante emplea una superficie plana modificada a la que se unen las lectinas por adsorción simple (sobre nitrocelulosa) ó por enlaces covalentes (a una superficie de vidrio modificada) (Fig. 5A).

La técnica de microarreglos de lectina de fase reversa dot-blot, es una variante que se basa en la unión de muestras que tienen glicoproteínas sobre la superficie del chip (Fig. 5B) y es otra de las técnicas de microarreglo de lectinas que más se usa, aunque existe una tercera variante que es la de un formato de ensayo tipo sándwich entre anticuerpos inmovilizados y lectinas (Fig. 5C).

En cada variante de microarreglos de lectinas dicha anteriormente, se utiliza un fluoróforo unido a una glicoproteína, y así detectar lectinas inmovilizadas sobre una superficie.

Hasta el momento los microarreglos de lectinas han dado resultados interesantes como detectar diferencias en los patrones de glicosilación, ó distinguir entre células normales y cancerígenas. Los patrones de glicosilación de la superficie celular cambian en las células malignizadas expresando diferentes azúcares en su superficie con respecto a los expresados en condiciones normales de salud (Krzeslak *et al.*, 2003). Un ejemplo de lectina que se puede emplear para la detección de cambios de expresión de glicosilación en células, es la aglutinina de cacahuete (PNA: del inglés Peanut agglutinin) descrito por Brinck *et al.*, en donde estos autores utilizan la PNA para detectar carcinomas humanos en mamas y colon (Brinck *et al.*, 1998). Recientemente se ha combinado los microarreglos de lectinas con la espectrometría de masas (EM) con la expectativa de desarrollar la Glicómica.

Esta combinación de ambas técnicas puede ser muy prometedora para la identificación de nuevos biomarcadores de enfermedades dando un cambio relevante en el diagnóstico biomédico (Gemeiner *et al.*, 2009).

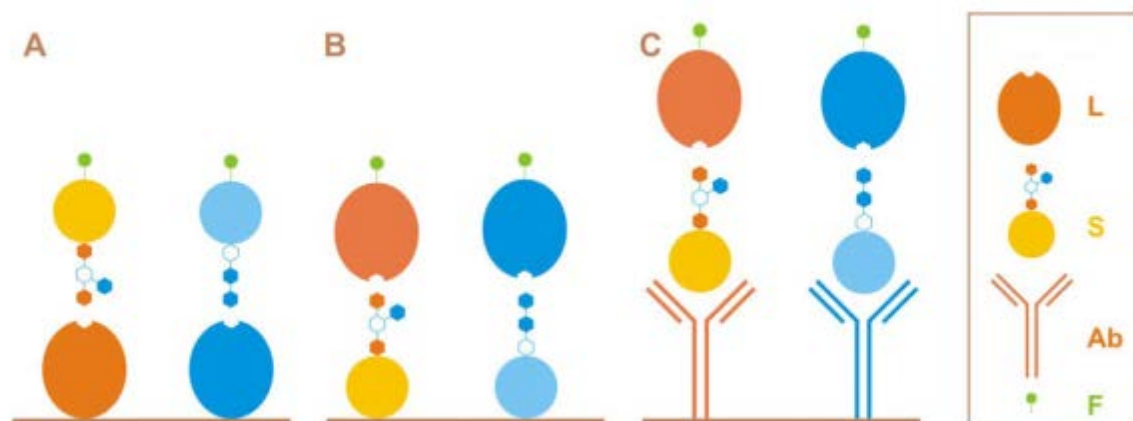


Figura 5. Diferentes tipos de microarrays de lectinas. A) Detección directa de lectinas inmovilizadas sobre una superficie y una muestra de glicoproteína marcada con un fluoróforo; B) Fase reversa dot-blot, la muestra con glicoproteína se inmoviliza sobre una superficie unida a una lectina marcada con un fluoróforo; C) Detección tipo sándwich, el anticuerpo unido a una superficie se une a glicoproteína unida a lectina marcada con un fluoróforo. L: Lectina (del inglés Lectin); S: Glicoproteína ó carbohidrato (del inglés Sugar); Ab: Anticuerpo (del inglés antibody); F: Fluoróforo (del inglés fluorophore) (Extraído de Gemeiner *et al.*, 2009).

Los arreglos de carbohidratos tienen una gran aplicación en el estudio de interacciones biomoleculares, resultando una muy buena herramienta para la detección de lectinas, anticuerpos anti-carbohidratos, entre otras moléculas de gran valor en investigación básica y tecnológica (Gemeiner *et al.*, 2009).

ii) Resonancia Magnética Nuclear (NMR): La NMR provee una buena herramienta para elucidar las interacciones lectina-carbohidrato, donde por diferentes metodologías de esta espectroscopia se pueden hallar datos como el sitio de unión al ligando u observar el proceso de unión al ligando, aunque por esta técnica aún no se puede obtener una estructura 3D detallada de los complejos lectina-carbohidrato (Nilsson, 2007).

iii) Titulación isotérmica calorimétrica (ITC): La ITC provee en forma directa la constante de asociación entre una proteína y su ligando en solución midiendo el calor de unión. Así mismo, por esta técnica se puede hallar la estequiometría de unión y todos los parámetros termodinámicos de unión en términos de la constante de sitios de unión y cambios en la energía libre, la entalpía de unión y la entropía de unión (Nilsson, 2007).

iv) Resonancia plasmódica de superficie (SPR): es una técnica que se usa para determinar la unión selectiva y las características de estructuras glicosídicas, mediante una lectina inmovilizada como un sensor biológico superficial. En esta, la lectina unida a una superficie de vidrio como biosensor óptico se usa para medir contenidos de carbohidratos en una muestra, a través de los cambios en el índice refractario, obteniéndose así parámetros como constantes de afinidad y parámetros cinéticos de este tipo de interacciones (Nilsson, 2007).

v) Elipsometría: Otra técnica usada recientemente, basada en fenómenos ópticos, es la elipsometría. Esta técnica permite obtener parámetros ópticos y estructurales mediante el cambio del estado de polarización de la luz reflejada de la superficie problema (Nilsson, 2007).

vi) Enzyme linked lectin assays(ELLA): Una forma rápida de detección de lectinas es por medio del ensayo de unión de enzima a lectina. El principio de esta técnica es similar al de la técnica de ELISA pero con algunas variantes. El ensayo de ELLA se basa en la unión de lectinas marcadas con biotina a glicoconjugados inmovilizados sobre una placa de ELISA. En los ensayos de Ella, se utiliza la avidina marcada con un fluoróforo para detectar lectina unida a carbohidratos o glicoproteínas (Mislovicava *et al.*, 2009).

1.4. Funciones biológicas de lectinas vegetales

Las lectinas vegetales fueron las primeras en identificarse y elucidar sus estructuras. Sin embargo, el rol que éstas tienen en los mismos permanece incierto. Aunque se han planteado muchas hipótesis para sus posibles funciones, las más conocidas han sido las relacionadas con sus roles fisiológicos (Sharon & Lis, 2007). Para el caso de las lectinas de Leguminosas, una de estas hipótesis asume que las lectinas están implicadas en el proceso de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, esencialmente de la familia Rhizobiaceae. Se presume que las lectinas presentes en las raíces de plantas leguminosas, se unen de manera específica a polisacáridos y lipo-polisacáridos de la superficie de la bacteria. Esto se llamó “hipótesis de reconocimiento de lectina” (Sharon & Lis, 2007).

En forma más general, otra hipótesis plantea que las lectinas cumplen un papel como agente de defensa, ya que para insectos y animales ciertas lectinas resultan tóxicas. Ejemplo de este tipo de lectina es la ricina, que es una lectina que inactiva ribosomas, la cual se extrae de la planta de aceite de ricino (*Ricinus communis*). Así mismo, algunas lectinas son inhibidores del crecimiento de hongos, como lo es la WGA, aglutinina de germen de trigo (del inglés Wheat germ agglutinin), que inhibe el crecimiento del hongo *Trichoderma viride*(Sharon & Lis, 2007).

1.5. Aplicaciones de lectinas vegetales

Las lectinas vegetales se utilizan para muchos fines tecnológicos y de investigación, siendo éstas una herramienta muy poderosa. A continuación se enumera las principales aplicaciones de estas proteínas, en solución:

i) Para identificación de glicoconjugados en mezclas complejas: la muestra se somete a una corrida electroforética en condiciones nativas en geles de poliacrilamida y luego se realiza una transferencia a una membrana, por ejemplo de nitrocelulosa, y se revela con lectinas (Sharon & Lis, 2007).

ii) Las lectinas se pueden usar para visualizar carbohidratos, obteniendo información en la localización y estructura de glicoconjugados presentes en células y tejidos. Ello ha permitido demostrar que los carbohidratos se distribuyen asimétricamente en la membrana citoplasmática.

iii) Asimismo, el análisis de tejidos provee información sobre patrones regionales y celulares de unión de lectinas en varios órganos, lo que hace que la interacción de lectina-carbohidrato es muy útil en técnicas de histoquímica y citoquímica. Las células microbianas también presentan carbohidratos en su superficie, lo que hace que las lectinas sean usadas en la identificación de estructuras de la superficie de microorganismos (Sharon & Lis, 2007).

iv) Mediante el uso de lectinas se pueden agrupar poblaciones de diferentes células en subpoblaciones, ya que estas últimas se diferencian en los carbohidratos que tienen en las superficies celulares. La aglutinación selectiva mediada por lectinas ha sido la técnica de separación celular más utilizada, aunque más recientemente han aparecido técnicas que combinan las

propiedades de las lectinas con técnicas bioquímicas tradicionales, como es la cromatografía de afinidad, en la que se puede utilizar lectinas inmovilizadas a los adsorbentes de afinidad (Sharon & Lis, 2007).

iv) Existe un grupo de lectinas, esencialmente de origen vegetal, que inducen el crecimiento y división de linfocitos. A dicho fenómeno se le llama estimulación mitogénica. La mayoría de las lectinas mitogénicas estimulan células T, pero no células B, por un mecanismo que no está totalmente entendido, que se basaría en la unión de lectinas a azúcares de la superficie celular. Esto sucede porque las lectinas se unen al receptor de la célula T que es el responsable de la estimulación antigénica específica y al que las lectinas no mitogénicas no se unen (Sharon & Lis, 2007).

v) Las aplicaciones de lectinas no solo se limitan a la investigación, sino también en el diagnóstico biomédico. Las principales aplicaciones en el área clínica son las siguientes (Gemeiner, 2009):

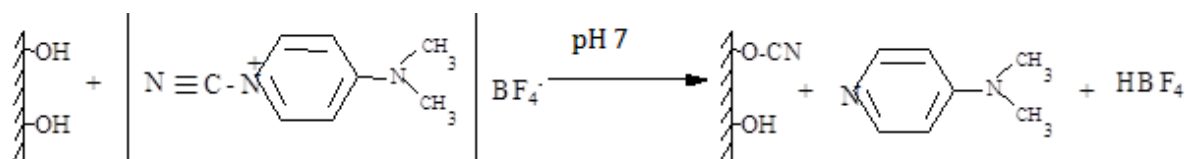
- a) clasificación de grupos de sangre y evaluación de inmunocompetencia (Sharon & Lis, 2007) ,
- b) detección de enfermedades relacionadas con alteración de glicoconjugados,
- c) detección de alteraciones por enfermedades en progreso (cáncer y metástasis),
- d) detección y diagnóstico de patógenos infecciosos (bacterias, virus, parásitos, hongos),
- e) uso en el mapeo de cromosomas, determinación del sexo a nivel cromosómico y detección de defectos cromosomales (Sharon & Lis, 2007).

1.5.1. Aplicaciones de las lectinas inmovilizadas

Las lectinas unidas a un soporte sólido (lectinas inmovilizadas) poseen diversas e interesantes aplicaciones. Por lejos, la más usada es en la purificación de glicocompuestos. Como ejemplo, se ha sintetizado un adsorbente de afinidad usando la lectina de soja (*Glycine max*) como ligando, la cual se inmovilizó y usó en procesos a escala de laboratorio, para la purificación y producción del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* cepa 14 (Franco Fraguas *et al.*, 2003). Otra importante aplicación es en el ámbito de producción de glicoproteínas. La bioseparación y purificación de productos es el principal inconveniente para las industrias biotecnológicas y farmacéuticas. Los procesos conocidos como “*downstream processing*”, generalmente representan el costo mayor en el proceso de la producción de proteínas. Esto, junto a los requerimientos cada vez mayores de productos con alta pureza y actividad, ha llevado a que en las últimas décadas se haya incrementado notablemente la aplicación de tecnologías selectivas en procesos de gran escala. Además, los adsorbentes insolubles ofrecen importantes ventajas que los ha llevado a un uso cada vez más generalizado en trabajos a escala analítica y están siendo cada vez más utilizados en el *downstream processing*.

La literatura abunda en información acerca del uso de las lectinas inmovilizadas para la purificación de una enorme variedad de glicoproteínas (Alborés, 2011). Las lectinas se pueden inmovilizar a la matriz por medio de diferentes interacciones, entre ellas las covalentes (Carlsson *et al.*, 1998). *Existen muchas estrategias químicas para realizar dicha inmovilización. Mencionamos acá, sólo la utilizada en el presente trabajo.*

El proceso de inmovilización covalente de una proteína implica un primer paso de activación del soporte (Sephacosa en este caso) mediante la introducción covalente de grupos químicos reactivos, los cuales reaccionarán luego, con grupos como $-NH_2$, $-SH$ y $-OH$ presentes en la proteína (el ligando). Una de las metodologías de activación es la que usa el reactivo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilamino-piridinio (CDAP), que permite introducir en el soporte grupos reactivos cianato éster (Carlsson *et al.*, 1998). La reacción de cianilación se muestra en la Fig. 6.



CDAP : tetrafluoroborato de 1 - ciano - 4 -
(dimetilamina) - piridinio (del inglés 1 - cyano -
4 - (dimethylamino) - pyridiniumtetrafluoroborate)

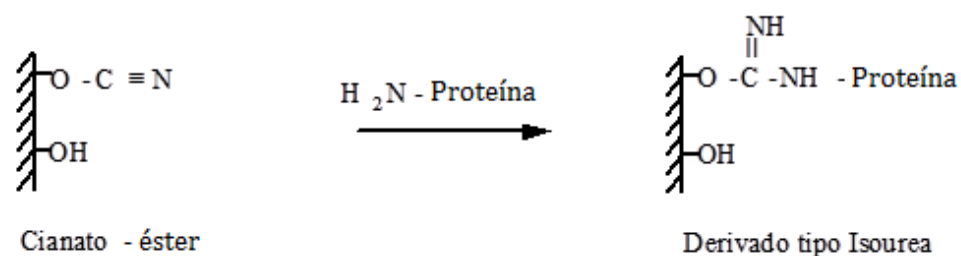


Figura 6. Activación de la matriz mediante una reacción de cianilación con CDAP y unión covalente de la proteína como ligando a la matriz (Adaptado de Carlsson *et al.*, 1998).

El soporte activado reacciona con los grupos amino de la lectina, los cuales es preferible que estén expuestos y no sean esenciales, para no comprometer la actividad posterior del derivado (Carlsson *et al.*, 1998). El resultado es la formación de un enlace de tipo iso-urea estable.

1.6. Lectina de ceibo (*Erythrina cristagalli*)

El ceibo (*Erythrina cristagalli*) es un árbol de mediano tamaño que recibe la siguiente ubicación en la clasificación según Linneaus:

Dominio: Eukaryota
Reino: Plantae
Phylum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Fabales
Familia: Fabaceae
Subfamilia: Faboideae
Tribu: Phaseoleae
Subtribu: Erythrinae
Género: *Erythrina*
Especie: *Erythrina cristagalli*

Variedades: a) leucochlora Lombardo

b) hasskarlii Backer



a)



b)

Figura 7. a) Ceibo flor roja (*Erythrina cristagalli*. var. *hasskarlii* Backer), (tomado de www.flordeplanta.com.ar). b) Ceibo flor blanca (*Erythrina cristagalli*. var. *leucochlora* Lombardo), (tomado de www.ceiboblanco.blogspot.com).

La clasificación según Linneaus para la *Erythrina cristagalli*, muestra dos variedades dentro de la especie. La primera variedad, la cual es más rara de encontrar, se caracteriza por tener flor blanca y, la variedad más comúnmente encontrada (muy frecuente en el Uruguay) por tener la flor roja (Fig.7).

Iglesias *et al.* (1982) aislaron, purificaron y caracterizaron por primera vez la lectina de *Erythrina cristagalli* (ECL) variedad *hasskarlii* Backer, a partir de semillas del ceibo rojo. La lectina es específica para Gal, aunque también reconoce Gal-NAc. Su peso molecular es de 56.8.kDa y está formada por dos subunidades de aproximadamente 28 y 26 kDa. Se ha reportado también que la ECL tiene mayor afinidad por fucosil-lactosa y fucosil-lactosamina que por N-acetil-lactosamina, lactosa, Gal-NAc y Gal (Turton *et al.*, 2004). La ECL interacciona mejor con disacáridos y oligosacáridos que contienen Gal β 1 $\rightarrow$ terminales y no reconoce moléculas que tienen Gal-NAc α 1 $\rightarrow$ terminal (Kaladas *et al.*, 1982). Se trata de una metaloproteína heterodimérica que en cada monómero contiene un ión Ca²⁺ y un ión Mn²⁺, los que se necesitan para la unión al carbohidrato (Emmerich *et al.*, 1994). Su composición aminoacídica muestra pocas metioninas y carece de cisteína, además de tener un alto contenido de aminoácidos ácidos y básicos. La valina se encuentra sólo en el extremo N-terminal (Iglesias *et al.*, 1982). La ECL está glicosilada en cada subunidad y tiene tres residuos de manosa, uno de fucosa, uno de xilosa y 2 de N-acetilglucosamina. El porcentaje de carbohidratos en esta glicoproteína alcanza el 4,5% (Iglesias *et al.*, 1982; Turton *et al.*, 2004). Los dímeros de la ECL forman un motivo tipo “handshake” que une ambas subunidades (Fig.8) y se ha demostrado que la presencia de oligosacáridos no afecta a su estructura terciaria y cuaternaria (Turton, et al., 2004).

La ECL, por su especificidad de unión a Gal y a Gal-NAc es una herramienta valiosa en el reconocimiento de biomoléculas. En el área del diagnóstico biomédico, se podría utilizar en la detección de diferentes enfermedades que presenten alteración en los perfiles de glicosilación de células. Entre estas posibles aplicaciones, se podrían enumerar desde la clasificación de grupos de sangre, detección y diagnóstico de agentes infecciosos, hasta la identificación de moléculas en solución que contengan Gal y Gal-NAc en su superficie. Esto denota la versatilidad y gran potencial tecnológico de la ECL (Wu *et al.*, 2007).

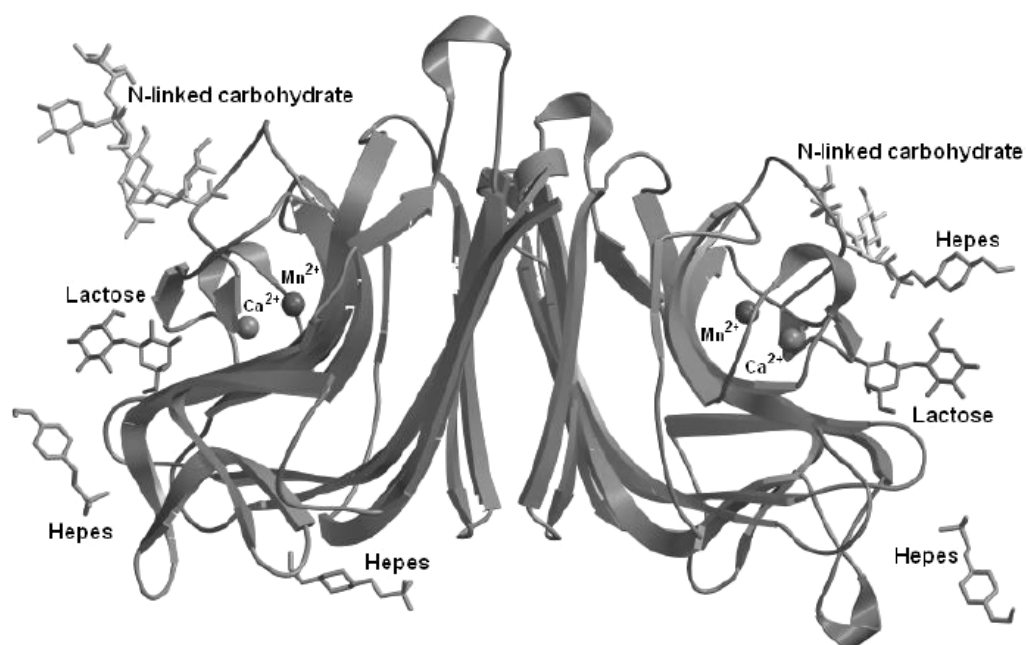


Figura 8. Estructura cristalográfica de la lectina de *Erythrina cristagalli* (ECL). Las subunidades se asocian por un motivo tipo *handshake* formado dímeros no canónicos. Dichos dímeros se estabilizan por puentes de hidrógeno y por el contacto de cadenas laterales entre si. Las dos subunidades forman una estructura tipo “jelly roll” propia de lectinas de leguminosas. Se puede ver los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} en el entorno del sitio de unión y la presencia de moléculas HEPES que son del medio cristalográfico (Extraído de Turton *et al.*, 2004).

2. MATERIALES Y METODOS

Las columnas NAP-5 y PD-10 (ambas de Sephadex G-25) fueron adquiridas a GE Healthcare (Reino Unido). La Sepharosa 4B fue adquirida en Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia). La sangre de conejo se obtuvo de la Unidad de reactivos para biomodelos de experimentación (Facultad de Medicina, UdelaR). Los carbohidratos D (+) glucosa, 1-amino-1-deoxi- β -D-Galactosa (Galactosil-amina), D (+) galactosa (Gal), L (-) fucosa, D (+) rafinosa, N-Acetil-D-lactosamina, α -lactosa, N-Acetil-D-galactosamina (Gal-NAc), las glicoproteínas fetuína de suero fetal bovino y ovalbúmina, así como el reactivo tetrafluoroborato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP) fueron de Sigma (St. Louis, MO, USA). El kit BCA para determinación de proteínas fue de Pierce (Rockford, IL, USA). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico.

2.1. Material vegetal

Las vainas de *Erythrina cristagalli* var. *hasskarlii* Backer (EC-hB) y var. *leucochlora* Lombardo (EC-IL) se colectaron de árboles pertenecientes al ornato público de la ciudad de Montevideo. Se separaron las semillas, se dejaron secar al aire y se guardaron en bolsas de plástico en refrigerador hasta su procesamiento.

2.2. Aislamiento y purificación de la lectina de *Erythrina cristagalli* (ECL) por cromatografía de afinidad

2.2.1. Preparación de los extractos de *Erythrina cristagalli*

Las semillas de EC-hB y de EC-IL se procesaron en molino obteniéndose una harina fina. A partir de 25 g de esta harina se realizó una extracción con solvente orgánica (usando *n*-hexano ó alternativamente éter de petróleo). Para la deslipidización, se colocó la harina en un matraz y se agregó el solvente en forma gradual mediante agitación continua durante 1.5 h a temperatura ambiente. Se filtró rápidamente con gasa descartando el líquido y la torta obtenida se dejó secando al aire durante 12 horas. Se tomaron 20 g de esta harina y se la

colocó en un recipiente. Se agregó 150 ml de buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.4 suplementado con NaCl 0.15 M (buffer PBS) en forma gradual mediante agitación continua durante 2.5 h. Se filtró por gasa y con papel de filtrar descartando el sólido y la solución resultante se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min, a 8°C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante clarificado se trató con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30 % de saturación. Se dejó durante 12 horas a 8°C y se centrifugó a 9000 rpm durante 30 min, a 8°C. Al sobrenadante se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en polvo hasta alcanzar el 60 % de saturación y se procedió como anteriormente. El precipitado obtenido se resuspendió en el mínimo volumen de buffer PBS, se centrifugó nuevamente a 9000 rpm durante 15 minutos, a 8°C, y el sobrenadante clarificado se utilizó para la purificación de la lectina.

2.2.2. Purificación de ECL por cromatografía de afinidad

Se preparó una columna empaquetada con el adsorbente Gal-Sepharosa (1.8 ml de gel sedimentado) disponible en el laboratorio y se equilibró con PBS. Se aplicó el extracto correspondiente (ver en resultados y discusión los volúmenes aplicados en cada caso) a la columna de Gal-Sepharosa. Se lavó con buffer PBS recolectándose fracciones de 6 ml hasta obtener una absorbancia a 280 nm (A_{280}) menor ó igual a 0.05 unidades y se eluyó con soluciones de Gal (0.1 M y 0.2 M) en PBS, recogiendo fracciones de 3 ml a una velocidad de flujo de 60 ml/h. Sobre cada fracción eluída se realizó ensayo de hemaglutinación usando glóbulos rojos de conejo (ver 2.4.3).

2.3. Síntesis del adsorbente ECL-Sepharosa y su aplicación en el reconocimiento de glicoproteínas modelo

2.3.1. Activación del soporte Sepharosa 4B con reactivo CDAP

La activación se realizó según Franco Fraguas *et al.*, 2003. Se pre-enfriaron todos los reactivos a 4°C y todas las pasos que se describen a continuación se realizaron en baño de hielo. El soporte (2.0 g de Sepharosa 4B) se lavó con agua destilada y se escurrió en placa filtrante. Se lavó luego con acetona: agua (3:7, v/v) y finalmente con acetona:agua (6:4, v/v). El gel escurrido se resuspendió en 2 ml de acetona: agua (6:4, v/v). Se pesaron 50 mg de

reactivo CDAP y se disolvieron en 1.3 ml de acetona: agua (6:4, v/v), agregándolo gota a gota a la suspensión de gel y agitando continuamente, durante 3 min. Luego, se agregó 200 µl de Trietilamina (TEA) 0.2 M gota a gota durante 2 min. y se dejó reaccionar durante 3 min.

Al cabo de ese tiempo toda la suspensión se vertió sobre 30 ml de HCl 0.05 M pre-enfriado. Se dejó actuar durante no más de 3 min., se pasó a placa filtrante y se lavó rápidamente el gel con agua destilada fría. Luego de este último lavado, el gel estuvo pronto para su uso inmediato.

2.3.2. Inmovilización de ECL en Sepharosa activada

Se juntaron todos los eluidos de la columna de Gal-Sepharosa que presentaban actividad HAG, la solución se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60 % de saturación y se dejó en heladera durante toda la noche. Se centrifugó a 9000 rpm a 8°C durante 30 min. y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en 2,5 ml de buffer PBS, se centrifugó nuevamente a 9000 rpm a 8°C durante 10 min. y el sobrenadante clarificado se gel filtró en columna PD-10 contra buffer NaHCO_3 0.2 M pH 8.3. La inmovilización de ECL se realizó según Franco Fraguas *et al.* (2003): 2.0 g de Sepharosa-activada (gel escurrido) se resuspendió en 3.5 ml de solución de lectina en buffer NaHCO_3 0.2 M pH 8.3 y la suspensión se colocó en columna vacía PD-10. Se agitó en rodillo durante 4 hs. a temperatura ambiente, se lavó luego con 50 ml de buffer de inmovilización (NaHCO_3 0.1 M pH 8.3), 50 ml de agua destilada y 20 ml de buffer PBS. Se guardó 100 mg del adsorbente sintetizado, para realizar la determinación de proteína inmovilizada en gel. El resto se usó en la preparación de la columna de afinidad. Se utilizó la relación: 1.0 g de gel escurrido corresponde a 1.55 ml de gel sedimentado (Franco Fraguas *et al.*, 2003).

2.3.3. Cromatografía de afinidad de glicoproteínas modelo en ECL-Sepharosa

Se usó una columna de plástico PD-10 vacía y se rellenó con 3 ml de gel sedimentado (ECL-Sepharosa). Las glicoproteínas usadas (todas preparadas en PBS) fueron fetuína de suero fetal bovino (2.16 mg/ml), asialofetuína (2.72 mg/ml, disponible en el laboratorio) y ovalbúmina (3.61 mg/ml).

En experimentos independientes, se aplicaron 150 µl de cada solución de glicoproteína y se recogieron fracciones de 400 µl (en placas de microtitulación). Se lavó la columna con buffer PBS y se eluyó con solución de Gal 0.1 M en PBS. Para los cálculos de concentración se usaron las absorptividades de $A_{280\text{nm}}^{1\%} = 4.5$ (para fetuína y asialofetuína) y $A_{280\text{nm}}^{1\%} = 7.5$ (para ovalbúmina) (Sober & Harte, 1968).

2.4. Analisis

2.4.1. Determinacion de ECL soluble e inmovilizada

La cuantificación de proteínas solubles se realizó mediante el método del ácido bicinónico (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Alícuotas de 100 µl de diluciones adecuadas de cada muestra se incubaron con 2 ml de reactivo BCA durante 15 min. a 60 °C en baño termostatzado y bajo agitación continua. Al cabo de ese tiempo las muestras se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 562 nm. Se realizó una curva de calibración usando seroalbúmina bovina (BSA) en rango de 0.0 – 0.25 mg/ml.

La determinación de ECL inmovilizada se realizó según Giacomini *et al.* (1998). Para ello, se tomó 100 mg de gel ECL-Sepharosa y se suspendió en 1 ml de agua (Solución standard 1, SS1). Bajo agitación magnética continua, se tomaron (por triplicado) 100 µl de SS1 y se colocaron en tubos de plástico con tapa (Nalgene) y se suspendió en 1 ml de agua destilada. (SS2). Se tomaron (por triplicado) 100 µl de SS2, a cada tubo Nalgene se agregó 2 ml de reactivo BCA y se incubó a 60 °C en baño con agitación durante 15 min. Se retiraron los tubos del baño, se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y se registró la absorbancia a 562 nm contra blanco. Se realizaron dos blancos, uno para medir las muestras de SS1 y otro para las de SS2, repitiendo el procedimiento descrito anteriormente pero usando en ambos casos el soporte Sepharosa 4B. Para todos los cálculos se usó para ECL la absorptividad $A_{280\text{nm}}^{1\%} = 14.3$.

2.4.2. Analisis electroforetico

Las fracciones de las cromatografías de afinidad en Gal-Sepharosa se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras utilizando un equipo PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia), y geles PhastGelTM Gradient 8-25 (GE, Suecia)

según las instrucciones del fabricante. Como marcadores de peso molecular se usó: fosforilasa b (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -lactalbúmina (14.4 kDa) (Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Todas las muestras se diluyeron con buffer de muestra (buffer Tris/HCl 10 mM, pH 8.0) conteniendo EDTA 1 mM, SDS 2 %, glicerol 10 % y β -mercaptoetanol 2.5 % v/v.

Para cada muestra se procedió de la siguiente manera: se colocó en un eppendorf 25 μ l de muestra, 25 μ l de sample buffer, 1 μ l de β -mercaptoetanol 2.5 % v/v y 1 μ l de azul de bromofenol 0.01 % (concentración final en la muestra a correr en la electroforesis), y luego cada tubo se calentó en baño a ebullición durante 5 min. Se sembraron en los geles alícuotas de 1 μ l y se realizaron las corridas según lo indicado por el fabricante. El revelado proteico de los geles se realizó mediante tinción con Coomassie Brilliant Blue (CBB) y tinción con plata según correspondiese, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Pharmacia).

2.4.3. Ensayo de hemaglutinación (HAG)

La actividad de lectina se estimó mediante el test de hemaglutinación (HAG) descrito por Nowak *et al.* (1976), usando glóbulos rojos de ratón y de conejo y mediante ensayo de dilución seriada al medio. Los glóbulos rojos se obtuvieron a partir de sangre fresca recogida en medio Alsever (ver Apéndice I), y se lavaron tres veces con buffer PBS mediante centrifugaciones suaves (3 min, 1500 g, 4 °C). A partir del pellet obtenido de eritrocitos, se preparó una suspensión en buffer PBS al 4 %. Los glóbulos rojos también se trataron con solución de tripsina (1mg/ml en PBS) y posterior fijación con glutaraldehído (1% v/v), como se describe en Plá *et al.*, (2003) (ver Apéndice II).

El ensayo de HAG se realizó en placas de microtitulación de fondo redondo según el siguiente protocolo: se agregaron (en ese orden) 25 μ l de NaCl 0.15 M, 25 μ l de BSA 1 % en NaCl 0.15 M, 25 μ l de muestra, y 25 μ l de la suspensión de eritrocitos al 4 % en PBS. La placa se agitó suavemente y se dejó en reposo por 30 min. a temperatura ambiente. Luego se realizó la lectura del test de HAG mediante análisis visual. El título de la lectina se define como el inverso de la dilución más alta capaz de causar HAG visible y se expresa como unidades de lectina (UL). La actividad hemaglutinante específica (AE) se define como el

cociente entre el título (UL/ml) y la concentración (mg/ml); el factor de purificación (PF) se define como el cociente entre AE después y la AE antes de la cromatografía de afinidad. Todas las fracciones eluídas de las columnas de Gal-Sepharosa se gel filtraron en columnas NAP-5, previo al ensayo de HAG.

2.4.3.1. Ensayos de inhibición de HAG

La especificidad hacia carbohidratos de la ECL se confirmó mediante ensayos de inhibición de HAG. Para ello en el ensayo de HAG descrito anteriormente, se sustituyó los 25 µl de NaCl 0.15 M por 25 µl de solución del carbohidrato correspondiente preparado en NaCl 0.15 M.

La dilución de la lectina usada para los ensayos de inhibición es aquella que causa el 50 % de HAG (la dilución anterior a la última capaz de causar HAG visible, HAG_{50%}).

Se define la concentración mínima inhibitoria (CMI) como la concentración mínima del carbohidrato que es capaz de inhibir la actividad HAG, y la potencia inhibitoria (PI) como el cociente entre la CMI del carbohidrato y la CMI para Gal (el carbohidrato específico para la lectina) usado como control. Los carbohidratos ensayados en el panel de inhibición fueron: D (+) Glucosa, Galactosil amina, D (+) Gal, Gal-NAc, L (-) Fucosa, α-Lactosa y D (+) Rafinosa, todos preparados en concentración 0,1 M en NaCl 0,15 M.

2.4.3.2. Efecto del EDTA en la hemaglutinación

Se evaluó el efecto de EDTA en la actividad de la lectina aislada de EC-IL, para ello se sustituyó en el ensayo 25 µl de NaCl 0.15 M del ensayo de HAG con 25 µl de soluciones de EDTA 0,1 M y 0,05 M y se repitió el ensayo como se describió.

2.4.4. Análisis espectrofotométrico de ECL-IL

Se realizó un barrido espectrofotométrico de la solución de lectina pura y en presencia de glucosa 25 mM ó de lactosa 25 mM, en el rango de 200-400 nm.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

A partir de las vainas recolectadas se obtuvieron 73 g de semillas secas de la variedad *hasskarlii* Backer (EC-hB) y 33.6 g de la variedad *leucochlora* Lombardo (EC-IL).

3.1. Extraccion y purificacion de la lectina de *Erythrina cristagalli* var. *hasskarlii* Backer (ECL-hB)

Las semillas de esta leguminosa poseen un alto contenido lipídico. Ello hace que cuando se preparan soluciones acuosas a partir de las mismas, éstas se vuelven rápidamente opalescentes y ello no resulta adecuado para posteriores trabajos con columnas cromatográficas, entre otras razones. Por ello fue necesario en nuestro caso realizar una deslipidización previa mediante tratamiento con solventes orgánicos, como forma de evitar la opalescencia y su efecto negativo posterior durante el proceso de purificación de la lectina. Se usaron dos solventes: *n*-hexano y éter de petróleo y se compararon los rendimientos de deslipidización. Los resultados se indican en la Tabla 1. No hay diferencias en el rendimiento de extracción con ambos solventes, lográndose en ambos casos, una reducción en peso del 10 %. Por lo tanto, se utilizaron para el trabajo las harinas deslipidizadas mediante ambos agentes en forma indistinta.

Tabla 1. Tratamiento de deslipidizacion de la harina de *Erythrina cristagalli* var. *hasskarlii* Backer (EC-hB)

Solvente	Masa harina (g)	Masaharina deslipidizada (g)	Rendimiento (%) *
<i>n</i> -hexano	25.0	22.7	91.0
Éter de petróleo	42.7	38.9	91.4

* El rendimiento fue calculado como el cociente: masa de harina deslipidizada/masa de la harina de partida *100.

Para la purificación de ECL-hB se utilizó la cromatografía de afinidad, y en base a la especificidad de la lectina, usando el adsorbente Gal-Sepharosa. Se ensayaron tres variantes de purificación las cuales se discuten a continuación. En cada etapa se monitoreó la presencia de lectina mediante ensayo de HAG de la forma como fue descrito en Materiales y Métodos.

Para el ensayo de HAG, se experimentó con glóbulos rojos de ratón tanto nativos como tripsinados y fijados con glutaraldehído, resultando en ambos casos, HAG negativa. Se utilizaron también glóbulos rojos de conejo nativos y tripsinados y fijados con glutaraldehído, y en este caso se obtuvo HAG positiva con ambos tipos de eritrocitos. Por lo que en el presente trabajo se utilizaron glóbulos rojos de conejo sin tratar.

3.1.1. Primera variante de purificación de la ECL-hB (E1)

A partir de 20 g de harina deslipidizada con *n*-hexano, se realizó la extracción acuosa usando buffer PBS como se indicó en Materiales y Métodos. Sobre el extracto clarificado se realizó un fraccionamiento salino usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, precipitando a 30% y 60% de saturación. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento salino del extracto de EC-hB con sulfato de amonio

Etapa	Vol (ml)	UA ₂₈₀ /ml	Título (UL/ml)	UL _{totales}	R (%)
Extracto deslipidizado	95.0	320	320	30400	100
S30	93.5	-	160	14960	49
SP30	15.0	28	-	-	-
S60	115.4	3.7	-	-	-
E1 (SP60)	8.0	415.8	2560	20480	67

S30: sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30% de saturación; SP30: extracto precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30% de saturación y resuspendido en PBS; S60: sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% de saturación; Extracto E1 (SP60): fracción S30 precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60% de saturación y resuspendida en PBS; UL: unidades de lectina. R: El rendimiento de la etapa fue calculado como el cociente entre las UL totales recuperadas en cada fracción y las UL totales del extracto * 100.

Se partió de 95 ml de un extracto deslipidizado (320 UL/ml) y se obtuvo 8 ml (2560 UL/ml) al final del fraccionamiento salino realizado, con un 67% de la actividad de lectina inicial aún presente en ese volumen. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Iglesias *et al.* (1982). En la fracción S30 aparece un 49% de las unidades de lectina que había originalmente en el extracto deslipidizado. En el precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30% de saturación, no se encontró presencia de lectina (no se muestra en la tabla), lo que indica que en esta etapa de precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hay lectina presente solamente en S30.

El descenso en la cantidad de lectina en S30 (49%) con respecto a la cantidad inicial en el fraccionamiento salino, es debido al error que tiene la dilución en el ensayo de HAG.

En el extracto E1 (SP60) se obtuvo el 67% de lectina que había inicialmente en el extracto deslipidizado, siendo este valor mayor al presente en S30. Este aumento de actividad de lectina con respecto a la fracción S30 se debe al error en la dilución introducido en el ensayo de HAG.

El extracto E1 se aplicó a una columna de Gal-Sepharosa y se obtuvo el perfil cromatográfico de la Fig. 9.

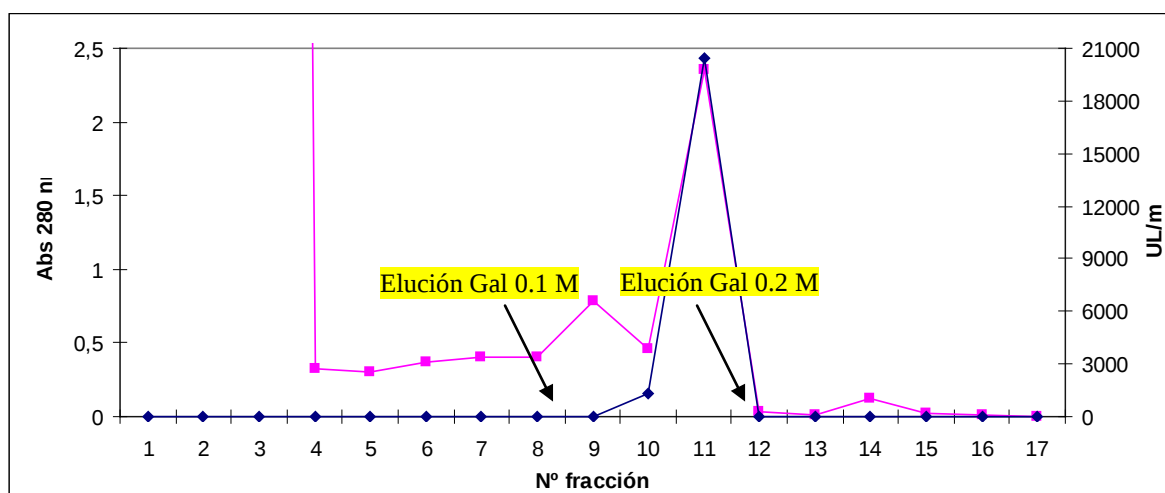


Figura 9. Perfil cromatográfico de la purificación de ECL-hB en Gal-Sepharosa

Abs 280 nm (—■—); UL/ml (—◆—) El inicio de la elución con 0.1 M Gal y Gal 0.2 M se indica con las flechas.

La elución de la lectina se realizó con Gal 0.1 M (fracciones 9-12) y posteriormente Gal 0.2 M (fracciones 13-17). Se detecta actividad de lectina en la elución con Gal 0.1 M, no

detectándose actividad HAG en los eluidos con Gal 0.2 M. Ello muestra que para la elución de ECL-hB de la columna de Gal- Sepharosa es suficiente una concentración de galactosa 0.1 M como agente competitivo.

En la Tabla 3 se muestra que toda la actividad HAG eluye con 0.1 M Gal, lo que demuestra la alta eficiencia y selectividad del adsorbente Gal-Sepharosa. Nuevamente se constata el error inherente al método, introducido en la estimación de la actividad de lectina mediante cálculo de dilución seriada al medio de la HAG.

Tabla 3. Purificación de ECL-hB en columna de Gal-Sepharosa

Etap	Vol. (ml)	UA₂₈₀/ml	UA₂₈₀	Título (UL/ml)	UL_{Totales}
Extracto E1	8.0	415.8	3326.4	2560	20480
Percolado ¹	6.0	438.4	2630.4	0	0
Elución con 0.1 M Gal	3.0	2.8	8.4	21760	65280
Elución con 0.2 M Gal	3.0	0.17	0.5	0	0

¹ Es el volumen anterior a los lavados con PBS.

Para corroborar la pureza alcanzada durante la cromatografía se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de las fracciones de la purificación realizada (Fig.10).

En dicho gel se observa que la fracción 11 de la elución con Gal 0.1 M (carril b) que es la que presentó mayor actividad de lectina, posee muchas bandas proteicas, entre ellas una banda de masa molecular aparente cercano a 28 kDa, que correspondería a la masa molecular de la subunidad del dímero de la ECL-hB (26 kDa y 28 kDa, según Iglesias *et al.*, 1982). Esta banda está también presente en el extracto (se observa en todos los carriles donde se sembró el extracto), pero no así en el carril de uno de los lavados de la columna (carril c). Ello corrobora los resultados de la Fig. 8. y Tabla 3, pero claramente nos muestra que la lectina está aún muy impurificada, ya que están presentes otros componentes proteicos del extracto.

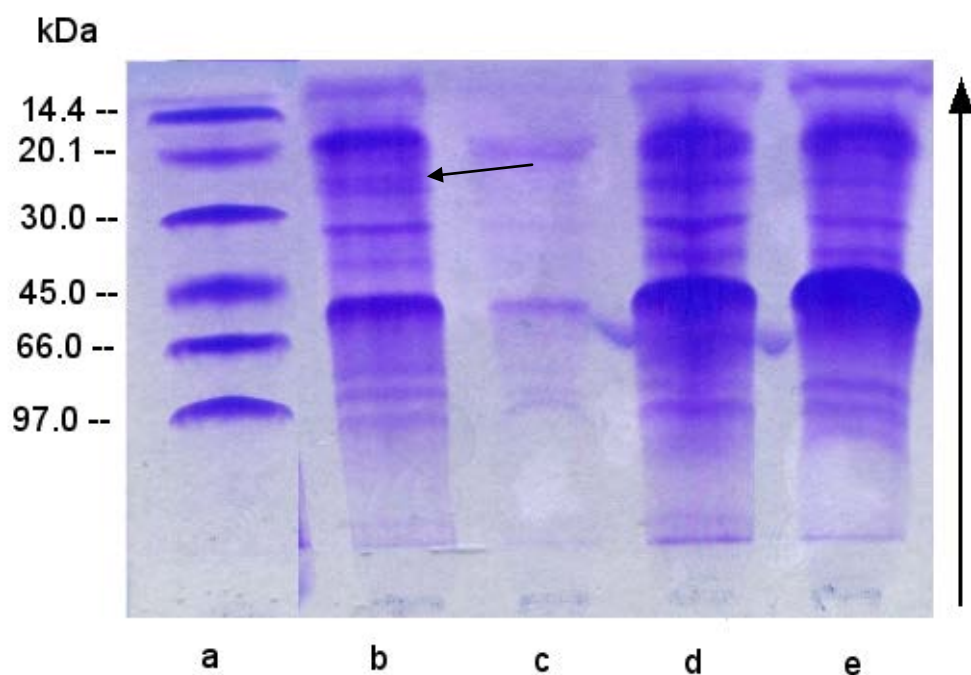


Figura 10. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad del extracto de ceibo en Gal-Sepharosa (corrida 1). Se utilizó un gradiente de gel de 8-25 % y se realizó tinción con Coomassie Brilliant Blue (CBB). Carriles a: estándares de peso molecular; b: eluido 11; c: fracción 3 de lavados; d y e: extracto deslipidizado.

Se tomó la fracción 11 de la cromatografía anterior (3 ml) y se gel filtró: 2.5 ml en columna PD-10 (Sephadex G-25) y 0.5 ml en columna NAP-25, para eliminar la galactosa de la solución y a ambos volúmenes gel filtrados se los juntó en una sola fracción (F11GF, 4.5 ml). Esta fracción presentó los siguientes valores 2.01 UA_{280}/ml y 61440 $UL_{Totales}$. Esta misma se re-cromatografió en una nueva columna de Gal-Sepharosa obteniéndose el perfil cromatográfico de la Fig. 11.

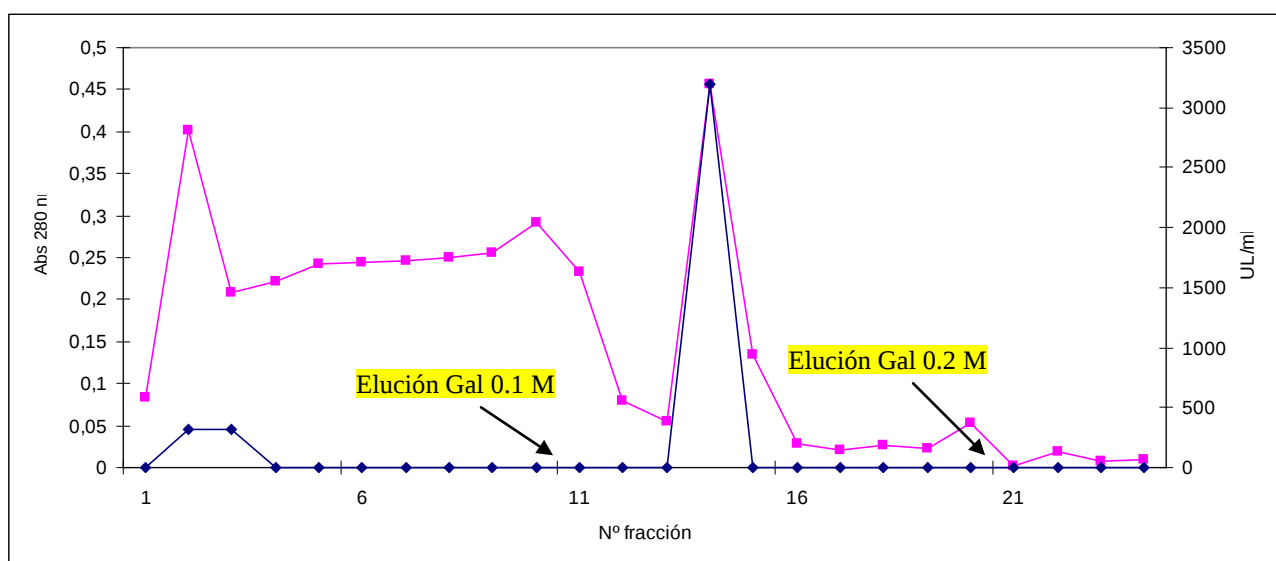


Figura 11. Perfil cromatográfico de la fracción F11GF en Gal-Sepharosa. Elución realizada con Gal 0.1 M y Gal 0.2 M en buffer PBS. A 280 nm (—■—); UL/ml (—◆—). El inicio de la elución con Gal 0.1 M y con Gal 0.2 M se indica con las flechas.

En la Fig. 11 se observa que en los lavados (fracciones 2 y 3) se pierde parte de la actividad de lectina, mientras que la mayor actividad se recupera en los eluidos con solución Gal 0.1 M. Nuevamente se observa que ésta, es suficiente para eluir la lectina: las fracciones eluídas con Gal 0.2 M no presentan actividad HAG.

Se corrió una nueva SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes para las distintas fracciones correspondientes a la re-cromatografía de F11GF (Fig. 12).

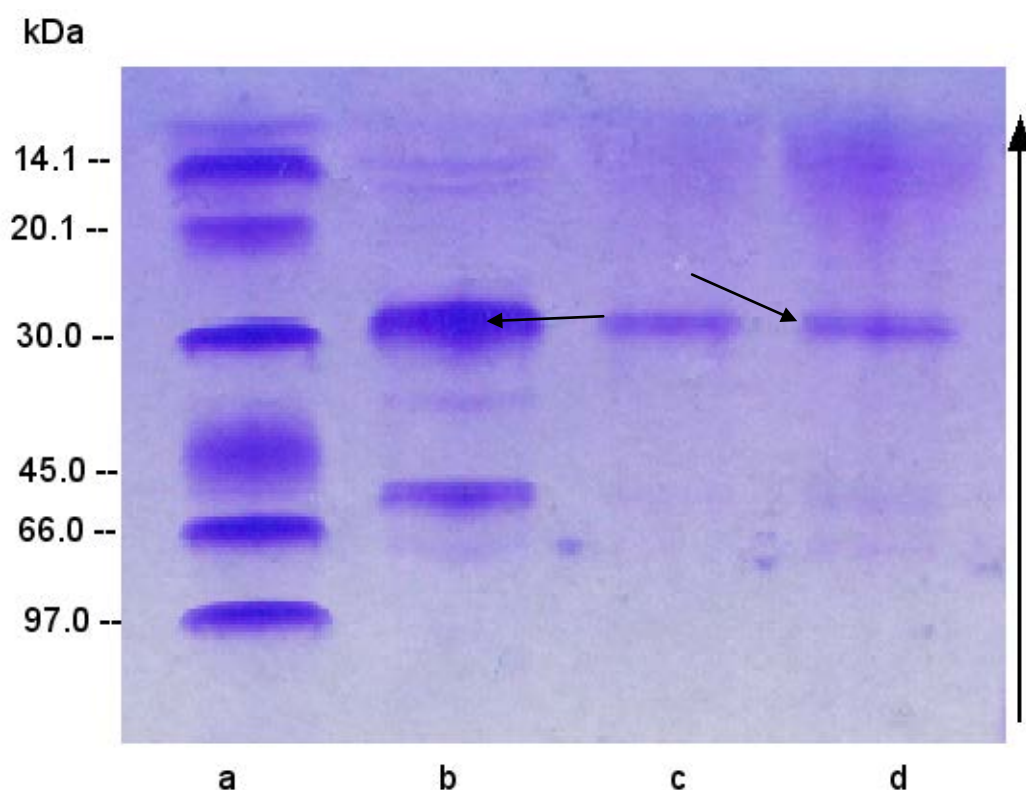


Figura 12. SDS-PAGE de la re-cromatografía de F11GF y tinción con CBB.

Carriles a: marcador de peso molecular; b: fracción F11GF; c: fracción 2 de lavados; d: E14, kDa = Kilodaltons.

En el eluido de la fracción 14 (E14) se observa la banda característica de ECL-hB con una masa molecular aparente de 28 kDa. Esta misma banda esta presente en F11GF y también en los lavados de la columna de afinidad, lo cual resulta coherente con la actividad de lectina detectada en los mismos. Es de notar que las bandas proteicas presentes en F11GF (carril b) no están presentes en la fracción 14 eluida con Gal 0.1 M. Esto evidencia claramente la efectividad de re-cromatografiar la fracción F11GF para poder así, conseguir un producto cromatográfico mucho más puro, aunque aún se observan bandas tenues en el entorno de los 14 kDa y 20 kDa (carril d).

Se realizó una nueva corrida SDS-PAGE en condiciones reductoras pero esta vez se realizó tinción plata (Fig.13). Este tipo de tinción es mucho más sensible que la de CBB, pero también es menos específica, ya que no tiñe solamente bandas proteicas, como lo hace el CBB, sino que también puede revelar bandas de glicocompuestos e incluso de ácidos nucleicos (Merril, 1990).

Nuevamente se observa, y en este caso bien intensa, la banda característica de la lectina de 28 kDa, pero también se observa tanto en el carril b como en el carril c otras bandas tan intensas como la anterior. Considerando los resultados de la Fig. 12 para estas mismas muestras, resulta claro que estas bandas no son proteicas. Sí resultan más nítidas y enfocadas en esta corrida, las dos bandas de pesos moleculares cercanos a 15 kDa.

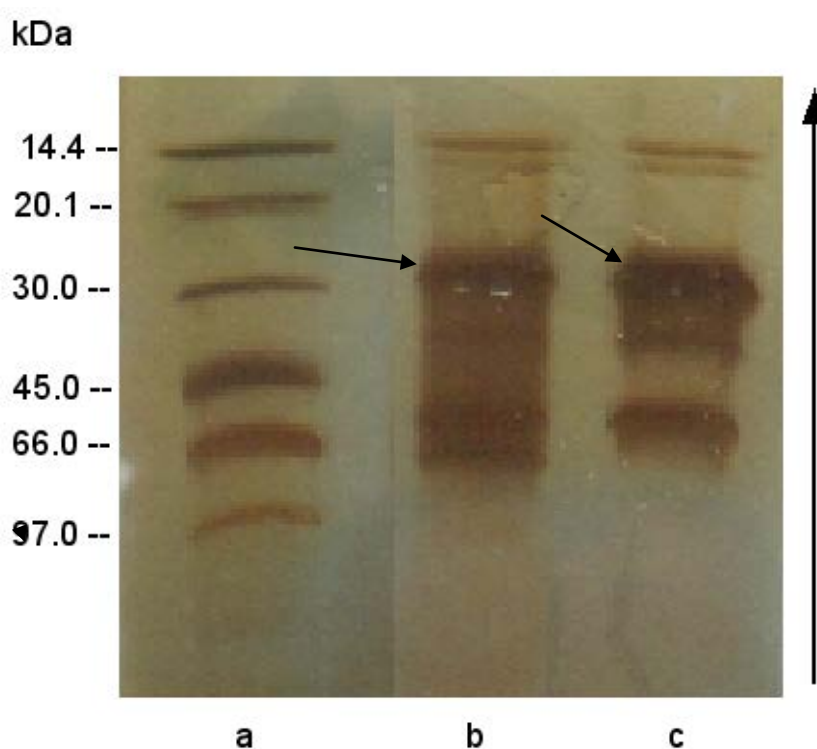


Figura 13. SDS-PAGE de la re-cromatografía de F11GF y tinción con plata. Carriles a: marcador de peso molecular, kDa = Kilodaltons; b: F11GF; c: E14.

Esta primera estrategia de purificación mediante cromatografía de afinidad en Gal-Sepharosa permitió recuperar la lectina en la fracción 11, con un factor de purificación alto (122, Tabla 4) aunque la electroforesis (Fig. 10) muestra que hay aún un alto grado de impurezas. La posterior re-cromatografía de la fracción 11 gel filtrada (F11GF) en Gal-Sepharosa introduzco una notoria mejora en la purificación de la ECL-hB como lo demuestra el patrón de bandas en la electroforesis de la Fig. 12. Este grado de pureza se obtuvo mediante el cálculo del factor de purificación (FP). En la fracción E14 se obtuvo menos cantidad de lectina pero en un grado mayor de pureza que para F11GF, lo que concuerda con su FP (1.3), el cual es más cercano a la unidad que para el caso de F11GF. La determinación de la concentración de proteínas indicada en la Tabla 4 se realizó utilizando el método del BCA (Smith et al., 1986) usando una solución de BSA estándar y utilizando la siguiente curva de calibración $y = 1.3458.x + 0.0245$, $R = 0.993$. A partir de ello se determinó una absorbancia de $A_{280nm}^{1\%} = 170$, la cual fue utilizada a lo largo de este trabajo, para el cálculo de la concentración de proteínas en extractos crudos, a partir del dato registrado de UA_{280}/ml .

Tabla 4. Purificación de ECL-hB en Gal-Sepharose.

Fracción	UA_{280}/ml	Proteína (mg/ml)	Vol. (ml)	Título (UL /ml)	AHE (UL/mg)	FP
Extracto (SP60)	415.8	24.5	8.0	2560	104.5	-
F11	2.35	1.6	3.0	20480	12800	122
F11GF	2.01	1.3	4.5	10240	7877	0.6
E14	0.457	0.32	1.0	3200	10000	1.3

UA_{280} = absorbancia a 280 nm; AHE = actividad hemaglutinante específica como se definió en Materiales y Métodos; FP = factor de purificación.

Para la lectina purificada se obtuvo un $A_{280nm}^{1\%} = 14.3$ que se usó en el resto del trabajo cuando fue necesario. Iglesias *et al.* (1982) en su trabajo reportan una absorbancia de $A_{280nm}^{1\%} = 12.4$ para la lectina purificada. Los resultados muestran también que la lectina

representa un 2.7 % del total de proteína soluble, el cual es un porcentaje mayor con respecto a lo obtenido por dichos autores, donde la lectina representa un 1.2 % del total de proteína soluble.

En nuestro caso, los cálculos de rendimiento realizados a partir de la lectina purificada obtenida en la fracción F11 indicarían que es posible obtener 4.8 mg de lectina pura a partir de 20 g de harina deslipidizada de semillas de ceibo rojo.

Finalmente, en la fracción F11GF se verificó la especificidad de la lectina, mediante ensayos de inhibición de HAG. Para ello se usaron como haptenos diferentes carbohidratos (Tabla 5).

Los resultados muestran que ECL-hB reconoce D (+) Gal y sus derivados y no hay reconocimiento con glucosa y fucosa, verificándose así la especificidad esperada según la literatura (Iglesias et al., 1982).

Tabla 5. Ensayo de inhibición de hemaglutinación frente a glóbulos rojos de conejo

Carbohidrato	Resultado HAG
D (+) Glucosa	+
L (-) Fucosa	+
D (+) Gal	-
Galactosil-amina	-
Gal-NAc	-
D (+) Rafinosa	-
α - Lactosa	-

HAG (+): no inhibe; HAG (-) inhibe.

3.1.2. Segunda variante de purificación de la ECL-hB (E2)

En esta instancia se partió de 39 g de harina que en este caso fue deslipidizada con éter de petróleo. Se repitió el mismo proceso de fraccionamiento salino que para la primera experiencia de purificación, obteniéndose 8.8 ml de extracto E2, con una concentración de proteínas de 80.5 mg/ml, tres veces la carga proteica aplicada a la columna en la variante 1.

Cuando se intentó aplicar los 8.8 ml a la columna de Gal-Sepharosa, luego de aplicar los primeros 6 ml se produjo un taponamiento de la misma por lo que no se continuó con el agregado de extracto. Se procedió a cambiar las placas de filtro de la columna y se lavó exhaustivamente la columna, lográndose en este caso el siguiente perfil cromatográfico (Fig. 14).

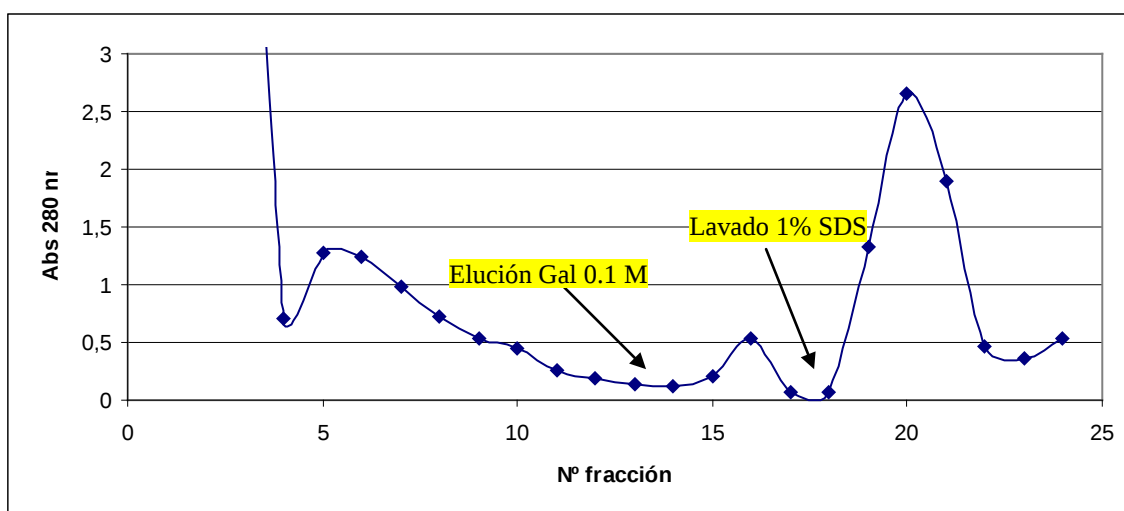


Figura 14. Perfil cromatográfico del extracto E2 en Gal- Sepharosa. El inicio de la elución con Gal 0.1 M y el lavado con SDS 1% se indica con las flechas.

Luego de la elución con Gal 0.1 M (fracciones 15-16) y debido al problema ocasionado por el taponamiento, se realizó un tratamiento de la columna con solución SDS 1% en PBS (fracciones 19-24).

Tabla 6. Resumen de las diferentes etapas de la purificación de E2 en Gal-Sepharosa

Etapas	Vol (ml)	UA₂₈₀/ml	UA₂₈₀
Extracto aplicado (E2)	6.0	1370	8220
Elución con Gal 0.1 M	3.0	0.88	2.6
Tratamiento con SDS 1%	3.0	7.2	21.7

Efectivamente, se observa en la fracción 20 (tratada con SDS 1 %) la presencia de varias bandas proteicas, correspondientes a otras proteínas del extracto, que se unieron inespecíficamente al adsorbente (Fig. 7) y presumiblemente relacionado al problema de taponamiento de la columna.

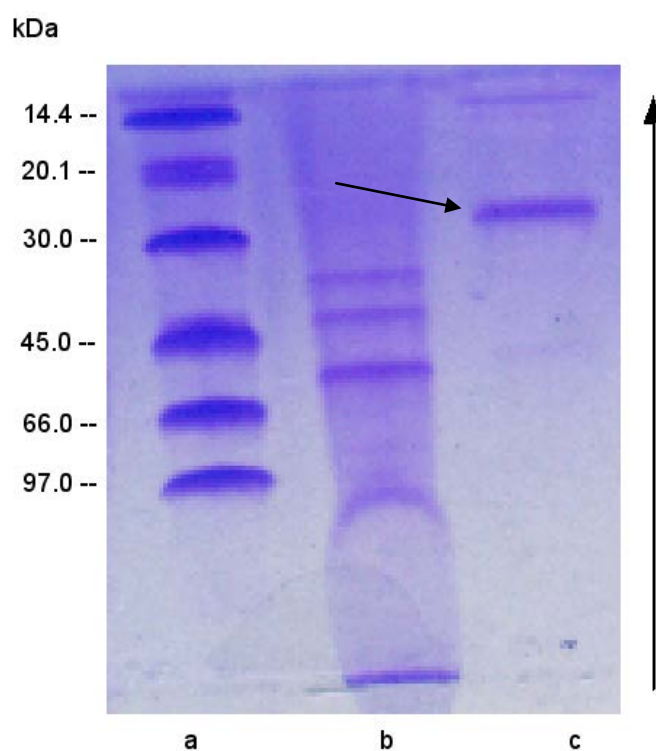


Figura 15. SDS-PAGE de los eluidos de la cromatografía de E2 en Gal-Sepharosa tinción con CBB. Carriles a =marcador de peso molecular, kDa = Kilodaltons; b = fracción 20; c =fracción 16.

Es de destacar que la banda característica de la lectina de 28 kDa aparece sólo en la fracción eluida con Gal 0.1 M, no estando presente en el tratamiento con SDS 1%.

Como conclusión de esta variante, no es adecuado aplicar a una columna de estas dimensiones (1.8 ml de gel sedimentado) una carga proteica de extracto superior a los 200 mg, ya que la aplicación de 480 mg taponeó la columna. Se constata también que a la hora de regenerar la columna antes de realizar una nueva corrida cromatográfica, el tratamiento con SDS 1% es altamente recomendable, ya que la lectina eluye en su totalidad con el agente competitivo como lo corrobora la electroforesis.

3.1.3. Tercera variante de purificación de ECL-hB (E3)

Dado el resultado del protocolo anterior, en este tercer experimento se repitió la estrategia pero aplicando una menor carga de proteína a la columna. Para ello se diluyó el extracto E2 al 1/3 en buffer PBS (en realidad una carga proteica similar a la del protocolo 1) y el perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Fig.16.

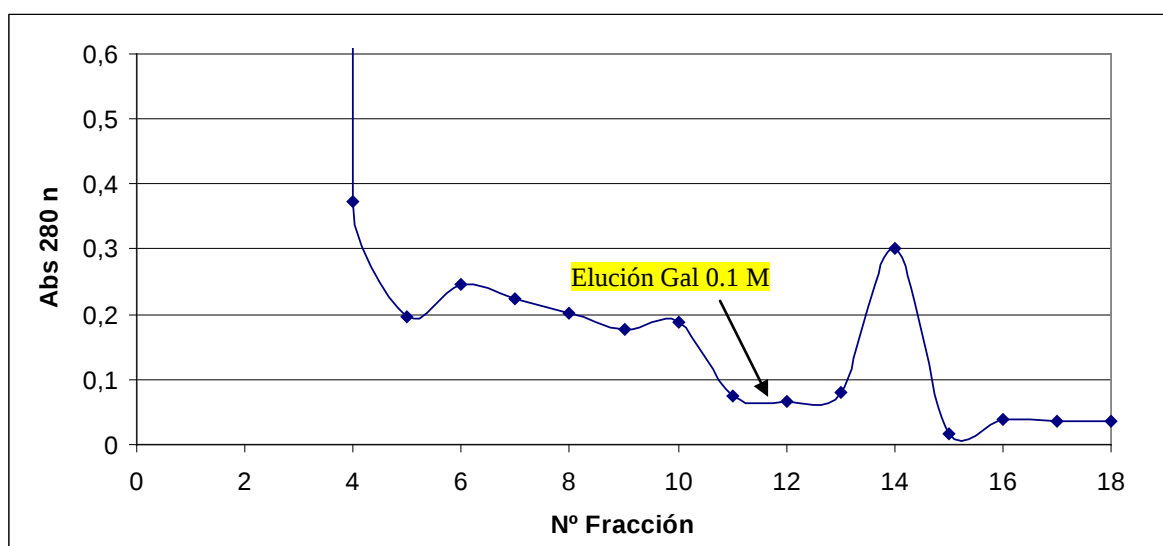


Figura 16. Perfil cromatográfico de E3 (dilución 1/3 de E2) en Gal-Sepharosa.

El inicio de la elución con Gal 0.1 M se indica con la flecha.

Tabla 7. Resumen de las diferentes etapas de la purificación del extracto E3 en Gal-Sepharosa

Etapas	Vol.(ml)	UA₂₈₀/ml	UA₂₈₀
Extracto E3	8.4	456.4	3834
Lavado con PBS	6.0	331.5	1989
Eluído con 0.1 M Gal	3.0	0.51	1.5

En este caso no se repitieron los problemas del segundo protocolo por lo que se concluyó entonces, que no se debe aplicar a la columna una carga superior a los 200 mg.

Los resultados obtenidos luego de aplicar los tres protocolos de purificación sugieren que para obtener la lectina con el menor grado de impurezas posible es conveniente que los eluidos de la cromatografía de afinidad en Gal-Sepharosa sean re-cromatografiados en las mismas condiciones.

3.2. Extracción, purificación y caracterización de la lectina *Erythrina cristagalli* var. *leucochlora* Lombardo (ECL-IL)

Dado que existe en nuestro país la variedad ceibo blanco y que la literatura no reporta información sobre lectinas en la misma, se incluyó en este trabajo un extracto proveniente de la variedad ceibo blanco, con el fin de evaluar si hay diferencias entre las lectinas obtenidas a partir de ambas variedades.

Para este caso, se partió de 33.6 g de harina preparada a partir de semillas de *Erythrina cristagalli* var. *leucochlora* Lombardo (EC-IL) y se procedió de la forma descrita en Materiales y Métodos. En esta oportunidad se realizó la extracción con 250 ml de éter de petróleo y posterior extracción acuosa con 215 ml de buffer PBS, obteniéndose un rendimiento de deslipidización de 83 % (Tabla 8).

Tabla 8. Tratamiento de deslipidización de la harina de EC-IL

Agente	Masa harina (g)	Masa harina deslipidizada (g)	Rendimiento (%) *
Éter de petróleo	33.6	27.9	83.0

* El rendimiento fue calculado como el cociente: masa de harina deslipidizada/masa de harina de partida *100

Se sugeriría que la extracción con éter de petróleo en este caso, es más efectiva que para la extracción con este solvente de la harina de EC-hB. Ello podría indicar una mayor cantidad de lípidos en la harina de las semillas de la variedad *leucochlora* Lombardo.

Se precipitó con sulfato de amonio procediendo como se indicó en Materiales y Métodos. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 9).

Tabla 9. Fraccionamiento salino del extracto de EC-IL con sulfato de amonio

Etapas	Vol. (ml)	UA ₂₈₀ /ml	Título (UL/ml)	UL	R (%)
Extracto deslipidizado	180.0	159.0	1600	288000	100
SP60	10.5	263.0	12800	134400	47

SP60: fracción S30 precipitado con (NH₄)₂SO₄ 60% de saturación y resuspendido en PBS.

El extracto SP60 presentó actividad hemaglutinante en un 47% con respecto a la actividad HAG del extracto deslipidizado. El descenso en la actividad de SP60 en relación al extracto deslipidizado, corresponde al error en la dilución del ensayo de HAG.

Sobre la fracción SP60, se realizó el ensayo de inhibición de hemaglutinación usando diferentes carbohidratos y glicoproteínas, para confirmar la especificidad de la lectina. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 10. Inhibición de HAG en extracto EC-IL frente a glóbulos rojos de conejo

Carbohidrato	Resultado HAG	CMI (mM)	PI
D (+) Glucosa	+	-	-
L (-) Fucosa	+	-	-
α – Lactosa	-	3.1	1
D (+) Gal	-	3.1	1
D (+) Rafinosa	-	3.1	1
N-Acetil-D-lactosamina	-	3.1	1
Galactosil-amina	-	25	8
Gal-NAc	-	25	8
Fetuína	+	-	-
Ovalbúmina	-	0.313 mg/ml	n.d

CMI: concentración mínima del carbohidrato que es capaz de inhibir la actividad hemaglutinante.

PI: la potencia inhibitoria, definida como el cociente entre la CMI del carbohidrato en estudio y la CMI de Gal tomada como referencia. HAG (+): no inhibe; HAG (-) inhibe. n.d: no determinada.

Se observó que tanto la glucosa como la fucosa no inhiben la HAG aún en concentración 100 mM; tampoco inhibe la fetuína, a concentración 5 mg/ml. La ovalbúmina inhibe la HAG hasta una concentración de 0.313 mg/ml. La mayor PI es para Galactosil-amina y Gal-NAc, 8 veces mayor que la de Gal (referencia). Los otros carbohidratos ensayados presentan PI similares al de Gal. Es de notar que la configuración del C4 del anillo de galactopiranosal al igual que para lo reportado para ECL-hB (Iglesias et al., 1982) es crucial para el reconocimiento del carbohidrato por parte de la lectina.

Se observó que los grupos amino y acetamido en el C2 del anillo de galactopiranosal no son esenciales para el reconocimiento de la lectina.

Se evaluó el efecto del EDTA en la actividad HAG sobre el extracto SP60. Se usaron dos concentraciones (50 mM y 100mM) y en ambos casos no se modificaron los resultados de la HAG. Teniendo en cuenta la posible presencia de iones metálicos en el sitio de unión a carbohidratos de esta lectina (ya que la ECL-hB tiene iones Ca^{2+} y Mn^{2+}) este resultado muestra que el EDTA, en caso de quelación de dichos iones, no afecta la actividad HAG de la misma a las concentraciones ensayadas.

Se ensayó la purificación de ECL-IL en columna de Gal-Sepharose de la forma descrita en la sección Materiales y Métodos, a partir del extracto SP60 diluido al 1/3 (extracto identificado como E1). Se aplicaron 18 ml de E1 a la columna de Gal-Sepharose (corrida 1). La elución se realizó con Gal 0.1 M (a partir de la fracción 14) y se obtuvo el perfil cromatográfico de la Fig. 17.

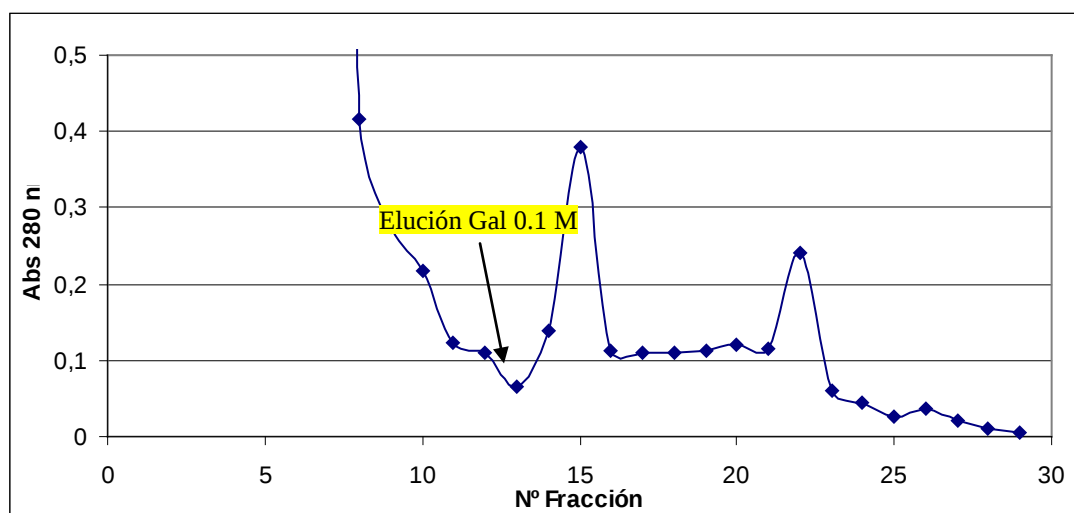


Figura 17. Perfil cromatográfico de ECL-IL (corrida 1) en Gal-Sepharose.El inicio de la elución con Gal 0.1 M se indica con la flecha.

Tabla 11. Resumen de la purificación de ECL-IL en Gal-Sepharosa (corrida 1)

Etapas	Vol.(ml)	UA ₂₈₀ /ml	UA ₂₈₀
E1	18.0	87.7	1579
Lavados con buffer PBS	6.0	490.1	2941
Elución con galactosa 0,1 M	3.0	1.6	4.9

Los resultados de HAG de los eluidos fueron negativos, probablemente por problemas en el estado de los glóbulos rojos, ó de pérdida de actividad de la lectina, por lo que no fue posible realizar los cálculos correspondientes. De todos modos, las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Fig. 19) y los resultados se discuten más adelante (luego de la corrida 2).

Con los restantes 13.5 ml de E1, se realizó una segunda purificación en una columna de Gal-Sepharosa obteniéndose el perfil cromatográfico de la Fig. 18 (corrida 2).

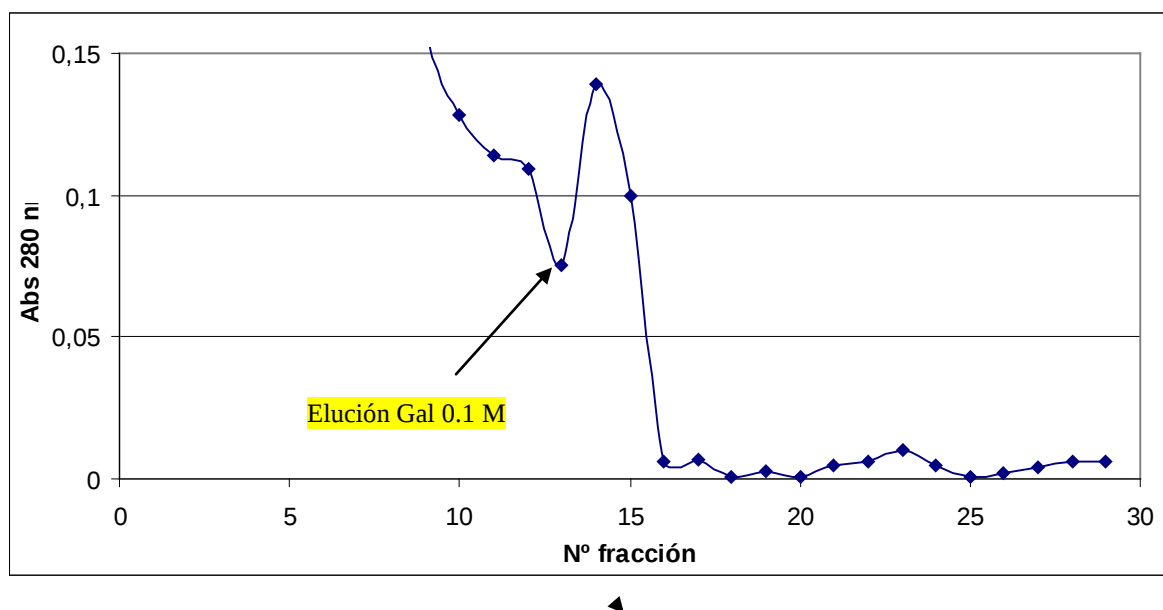


Figura 18. Perfil cromatográfico de ECL-IL (corrida 2) en columna Gal- Sepharosa. El inicio de la elución con Gal 0.1 M se indica con la flecha.

Tabla 12. Purificación de ECL-IL columna de Gal-Sepharosa (corrida 2)

Fracción	UA ₂₈₀ /ml	Proteína (mg/ml)	Vol. (ml)	Título (UL /ml)	AHE (UL/mg)	FP
E2	87.7	5.2	13.5	4266.7	820.5	1
14	0.139	0.1	3.0	1280	12800	16

UA₂₈₀ = absorbancia a 280 nm; AHE = actividad hemaglutinante específica; FP = factor de purificación, como se definió en Materiales y Métodos.

En el perfil cromatográfico de la Fig. 18 se observa un pico en la fracción 14 eluída con Gal 0.1 M. En este caso se realizaron los cálculos de actividad correspondientes, determinándose que el factor de purificación de ECL-IL fue de 16 (Tabla 12), el cual representa casi ocho veces menor que el correspondiente obtenido en la purificación de ECL-hB.

Se realizó una SDS-PAGE de las fracciones y los resultados se indican en la Fig. 19.

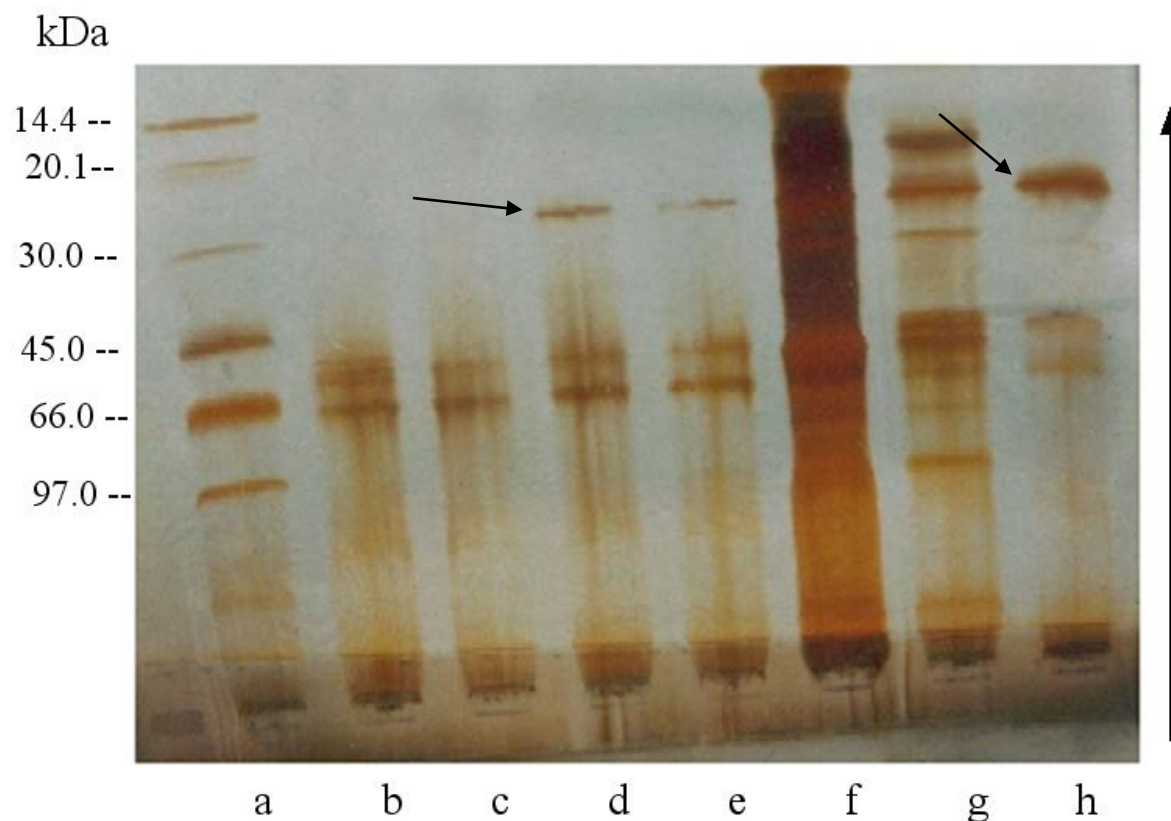


Figura 19. SDS-PAGE de varias fracciones correspondientes a las corridas 1 y 2 de E1 en Gal-Sepharosa. Tinción con plata. kDa : Kilodaltons. Carriles a: marcador de peso molecular; b: eluído 22 de corrida 1; c: eluído 18 de corrida 1; d: eluído 14 de corrida 2; e: lavado 9 de corrida 2; f: lavado 4 de corrida 2; g: lavado 7 de corrida 2; h: eluído 15 de corrida 1.

Se observa en los carriles d y e, la presencia de una banda de alrededor de 27 kDa, tratándose probablemente de la subunidad de ECL-IL. Se observó además de esta banda, la presencia de un doblete a pesos moleculares cercanos a 66 kDa, destacándose claramente una pureza mucha mayor en E14 de ECL-IL respecto al correspondiente eluído de ECL-hB (F11, ver primera variante de purificación de ECL-hB).

Los cálculos de rendimiento realizados para ECL-IL a partir de los resultados de la fracción 14 de la corrida 2 indicarían que es posible obtener 8.2 mg de lectina pura a partir de 20 g de harina deslipidizada de semillas de ceibo blanco, casi el doble del rendimiento obtenido para ECL-hB (4.8 mg de lectina / 20 g de harina deslipidizada). De todos modos se deben corroborar estos rendimientos en futuras corridas a realizar.

Por otra parte se analizó el efecto de glucosa y de lactosa sobre la lectina, mediante registro del espectro UV-Vis de las mezclas, en la zona del espectro cercana a los 280 nm (rango 200-400, Fig. 20). Se observa que la lactosa perturba el espectro UV de la lectina en la región aromática y que este efecto es específico, ya que la glucosa prácticamente no afecta el espectro respecto al de la lectina sola. Ello estaría poniendo de manifiesto la importancia de la exposición de los residuos aromáticos (como triptófano y tirosina) de/ó cercanos al sitio activo, durante la interacción con estos carbohidratos.

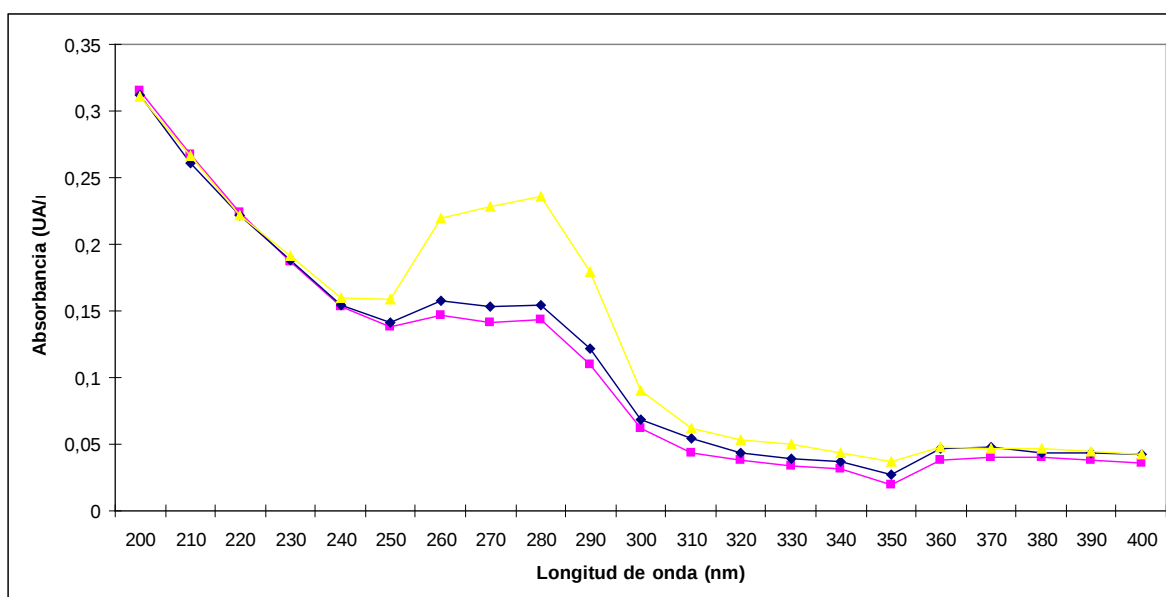


Figura 20. Barrido espectrofotométrico de la ECL-IL (0,1 mg/ml), en presencia de 25 mM lactosa y 25 mM glucosa. ECL-IL (—■—); ECL-IL + glucosa (—◆—); ECL-IL + lactosa (—▲—).

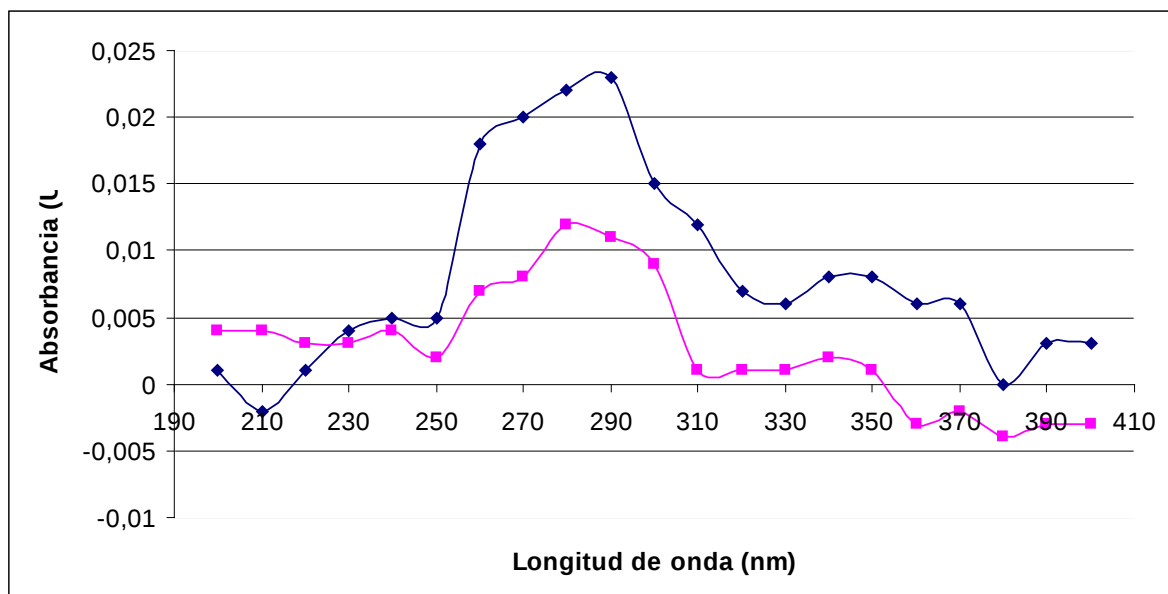


Figura 21. Espectros diferenciales para ECL-IL (0,1 mg/ml) en presencia de 25 mM lactosa y 25mM glucosa. Espectro diferencial para glucosa (____ ■ ____); Espectro diferencial para lactosa (____ ◆ ____).

Este efecto resulta más evidente al analizar el espectro diferencial de la lectina nativa y en presencia de lactosa, y entre la lectina nativa y en presencia de glucosa (Fig. 21). Aquí se evidencia además, que la máxima absorción ocurre en el primer caso (lectina + lactosa) a 291 nm.

3.3. Inmovilización de ECL-hB

Para la inmovilización de la lectina se usó como soporte Sepharosa 4B activada con reactivo CDAP, el que introduce estructuras reactivas de tipo cianato éster que reaccionan posteriormente con los grupos aminos de la lectina (Franco Fraguas *et al.*, 2003).

Tabla 13. Inmovilización de ECL-hB en Sepharosa 4B

Adsorbente de afinidad	Vol. ¹ (ml)	ECL-hB ² (mg/ml)	Peso gel ³ (g)	ECL-hB ⁴ (mg/g gel)	Rendimiento de la inmovilización ⁵ (%)
ECL-hB-Sepharose	3.5	0.28	2.0	0.24	49.0

¹ volumen de ECL-hB a inmovilizar.

² concentración de ECL-hB a inmovilizar.

³ peso escurrido de soporte Sepharose 4B

⁴ concentración de ECL-hB inmovilizada

⁵ % calculado como el cociente: mg totales de ECL-hB inmovilizada/mg totales de ECL-hB puestos a inmovilizar * 100.

La cantidad de lectina inmovilizada se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA). Se utilizó una curva de calibración con BSA ($y = 0.024.x + 0.0025$, $R^2 = 0.9998$), obteniéndose una concentración de 0.24 mg de ECL-hB/g de gel escurrido con un 49 % de rendimiento de inmovilización (Tabla 13). El derivado se utilizó para evaluar el reconocimiento de glicoproteínas modelo.

3.4. Interacción entre ECL-hB-Sepharosa y glicoproteínas modelo

Se evaluó la interacción entre la lectina inmovilizada y las glicoproteínas, a través del análisis del comportamiento cromatográfico de las mismas, aplicadas a mini-columnas del adsorbente. Se utilizaron dos glicoproteínas: ovalbúmina y fetuína, ambas de origen comercial, y adicionalmente, asialofetuína, disponible en el laboratorio y obtenida mediante desialilación química de fetuina comercial. Los resultados de dicha interacción se midieron a través de los % de adsorción de las glicoproteínas, calculados luego de eluirlas de la columna (Tabla 14).

Tabla 14. Cromatografía de afinidad de glicoproteínas en ECL-hB-Sepharose

Glicoproteína	Vol. (ml) ¹	Proteína (mg/ml) ²	Proteína (mg/ml) ³	% adsorción ⁴
Fetuína	0.15	2.16	0.33	5
Asialo-fetuína	0.15	2.72	0.13	23
Ovalbúmina	0.15	3.61	0.06	26

¹ volumen aplicado a la columna.

² concentración de proteína aplicada a la columna.

³ concentración de proteína eluída.

⁴% calculado como el cociente: mg totales de glicoproteína adsorbida y eluída de la columna/mg totales de glicoproteína recuperada de la columna al final de la cromatografía.

La fetuína posee cadenas de D-Gal β ₁→ 4D-GlcNAc β ₁ las cuales están bloqueadas por ácido siálico terminal (Kaladas, 1982). Ya ha sido documentado que la ECL-hB es una lectina que es específica para Gal β ₁→ GlcNAc (Iglesias, 1982), aunque también se ha reportado que Gal β ₁→ 4GlcNAc y Gal β ₁- oligosacáridos relacionados, son elementos de unión a la ECL-hB (Wu et al., 2007).

Es de observar en la Tabla 14 que la ECL.hB inmovilizada sólo es capaz de adsorber y eluir competitivamente un 5 % de la fetuina aplicada, mientras que la pérdida del ácido siálico terminal de esta glicoproteína, modifica la adsorción que ahora es de 23 %. Ello muestra que el ácido siálico estaría enmascarando al ligando Gal y así, está menos accesible para la interacción. Su posterior eliminación (asialo-fetuína) permite que parte de

los residuos de Gal sean ahora reconocidos por la lectina. De todos modos, el % de adsorción/elución es bajo, quizá debido a la influencia que ejercen los residuos laterales en la cadena de oligosacáridos de la glicoproteína.

Para el caso de la ovalbúmina solo se puede comentar que para esta glicoproteína, nuevamente el % de adsorción es bajo, aunque del mismo orden que la fetuina desialilada. En este caso, como no se contaba con la glicoproteína desialilada, no se pudo evaluar el efecto del ácido en la interacción. Se deberían realizar estos experimentos como forma de evaluar el efecto del ácido siálico en la interacción entre la lectina de ceibo y los residuos de Gal más expuestos en la glicoproteína.

Es interesante además, observar el comportamiento de estas glicoproteínas, a lo largo de todo el proceso cromatográfico en la columna, lo cual nos puede aportar algunos datos interesantes sobre la interacción. La Fig. 23 nos muestra las diferencias en el comportamiento cromatográfico individual de estas glicoproteínas frente a ECL-hB-Sepharosa. Se observa que tanto la fetuina como la ovalbúmina se adsorben rápidamente en las tres primeras fracciones, en tanto que asialofetuína, lo hace en forma mucho más lenta y dispersa.

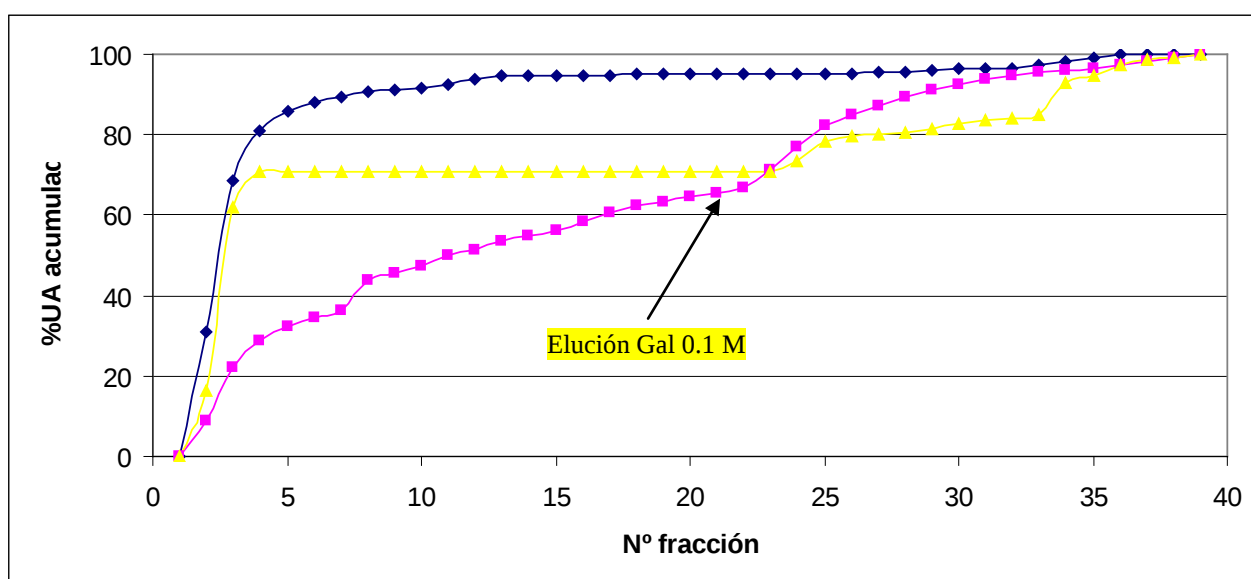


Figura23. Perfil cromatográfico de las glicoproteínas en ECL-hB-Sepharose.

El inicio de la elución con 0.1 M Gal se indica con la flecha. Asialofetuína (—■—); Fetuína (—◆—); Ovalbúmina (—▲—). El inicio de la elución con 0.1 M Gal se indica con la flecha.

Se observa también la clara diferencia en el comportamiento entre fetuina y asialofetuina. Y ya en la fracción 5 durante el lavado con PBS cerca del 85 % de la glicoproteína pasó incambiada por la columna en tanto que el 23% de la forma desialilada es retenida por la columna. La ovalbúmina presenta un comportamiento similar a la fetuina, en el sentido que lo que se adsorbe (26%), lo hace rápidamente y antes de la fracción 5 de lavado. Sin embargo, la elución por competencia con Gal 0.1 M es progresiva como en el caso de asialofetuina.

4. CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

La deslipidización de extractos preparados a partir de semillas de *E. cristagalli* var. *hasskarlii* Backer fue similar con cualquiera de los dos solventes utilizados en este trabajo: *n*-hexano y éter de petróleo y se logró remover un 10 % del material lipídico. Se observó que la var. *leucochlora* Lombardo tiene un mayor contenido lipídico extraíble con éter de petróleo, el cual representa el 17 % del peso seco de semillas.

La cromatografía de afinidad en Gal-Sepharosa es un proceso adecuado para la purificación de la lectina de ceibo y la pureza de la misma se puede mejorar si se procede a la re-cromatografía del material eluído. En cualquier caso, una concentración de Galactosa 0.1 M es suficiente para eluir competitivamente la lectina de la columna de afinidad Gal-Sepharosa.

Se aisló y purificó exitosamente la EC-IL y se encontró que como para EC-hb, se trata de una lectina específica para galactosa y sus derivados y que su subunidad posee una masa molecular aparente cercana a los 28 kDa.

Se logró sintetizar un adsorbente de afinidad, EC-hB-Sepharosa, el cual resultó ser una herramienta interesante para evaluar la interacción entre la lectina y glicoproteínas. El análisis de los comportamientos cromatográficos permitió visualizar claramente el efecto que produce el ácido siálico terminar contiguo a la galactosa más expuesta en la cadena oligosacarídica de la fetuina, donde ejerce un efecto de apantallamiento el cual desaparece al desililar la proteína. La eliminación del ácido permite incrementar en 5 veces la cantidad de fetuina unida a la columna. Se deberían realizar estudios similares con la ovalbúmina y otras glicoproteínas (nativa y desialilada) para evaluar la magnitud del efecto producido por este ácido terminal.

Como trabajos a futuro, se debería profundizar en la caracterización bioquímica de la lectina purificada a partir de semillas del ceibo blanco, ya que no hay reporte de esta lectina.

En el caso de la inmovilización de la ECL-hB en Sepharosa, se debería preparar un adsorbente con mayor densidad de lectina inmovilizada y ver el efecto de este factor en la adsorción de glicoproteínas.

Resulta claro también, que se debería inmovilizar la EC-IL y comparar el comportamiento cromatográfico de ambas lectinas, frente a las mismas glicoproteínas. Ello permitirá aportar al conocimiento de la interacción entre estas lectinas y las glicoproteínas y así determinar la potencial aplicación de estos adsorbentes a la purificación de estas glicoproteínas a partir de los materiales de partida.

5. APENDICE

I - Composición del medio Alsever

- NaCl 4.2 g/L
- Ácido cítrico•3Na•2H₂O 8.0 g/L
- Ácido cítrico•2H₂O 0.55 g/L
- D-(+)-Glucosa 20.5 g/L

II - Procedimiento de tripsinacion y fijacion con glutaraldehido

- 1) Lavado de globulos rojos con PBS (3 veces por centrifugación a 1500g por 3 min en cada lavado).
- 2) Agregar en un eppendorff 1 ml de una solución de tripsina 1 mg/ml en PBS.
- 3) Incubar en baño a 37°C durante 1 hora.
- 4) Centrifugar y luego lavar con PBS (por centrifugación) aproximadamente 6 veces.
- 5) Se incuba el pellet tripsinado con 5 volúmenes de glutaraldehido 1% en PBS a temperatura ambiente y durante 1 hora.
- 6) Centrifugar y terminar la fijación con 5 volúmenes de glicina 0.1 M en PBS a 4°C.
- 7) Centrifugar y luego lavar 2 veces con glicina 0.1 M en PBS.
- 8) Lavar 2 veces con PBS. Preparar suspensión al 4 % en PBS.

BIBLIOGRAFIA

Alborés, S. (2011). Tesis doctoral: Producción de lectinas de hongos basidiomicetes y estudio de sus interacciones frente a glicocompuestos. Facultad de Química, UdelAR.

Bourne, Y., Rouge, P & Camhillau, C. (1992). X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.3-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 267:197-203.

Boyd, W.C.& Shapleigh, E. (1954a). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science* 26: 119:419.

Boyd, W.C.& Shapleigh, E. (1954b). Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. *J. Immunol.* 73:226-231.

Brinck, U., Korabiowska, M., Bosbach, R & Gabius, H.J. (1998). Detection of inflammation and neoplasia-associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. *Acta Anat.* 161: 219-223.

Brooks, S.A., Leatham, A.J.C. & Schumacher, U. (1997). *Lectin Histochemistry: a concise practical handbook*. 1st Edition, editado por Brooks, S.A., Leatham, A.J.C and Schumacher, U. Bios Scientific Publishers. Capítulo 1.

Carlsson, J., Janson, J.C. & Sparman, M. (1998) Affinity chromatography; en *Protein purifications: principles, high-resolution methods, and applications*, Second Edition, editado por Jan-Christer Janson & Lars Rydén, Wiley-VCH Inc. Capítulo 10.

Chandra, N.R., Prabu, M.M., Suguna, K & Vijayan, M. (2001). Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. *Protein Engineering*. 14: 857-866.

Emmerich, C., Helliwell, J.R., Redshaw, M., Naismith, J.H., et al. (1994). High-resolution structures of single-metal-substituted concanavalin A: the Co, Ca-protein at 1.6Å and the Ni, Ca-protein at 2.0Å. *Acta Crystallogr.D*50: 749–756.

Franco Fraguas, L., Carlsson, J & Batista-Viera, F. (2000). The adsorption/desorption behaviour of horseradish peroxidase and porcine thyroglobulin on ConcanavalinA-Sepharose with different ligand densities. *International Journal of Bio-Chromatography*54:255 – 265.

Franco-Fraguas, L., Plá, A., Ferreira, F., Massaldi, H., Suárez, N & Batista-Viera, F. (2003). Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *J. Chromatography B* 790: 365-372.

Gabius, H.J. (1997). Animal lectins. *Eur. J.Biochem.* 243:543-576.

Gallego del Sol, F., Nagano, C., Cavada, B., Sampaio, A., Sanz, L & Calvete, J.J. (2006). Lectinas. *Investigación y Ciencia*. Octubre: 156-165.

Gemeiner, P., Mislovicava, D., Tkac, J., et al. (2009). Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnology advances* 27: 1-15.

Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L. & Batista-Viera, F. (1998). Immobilization of b-galactosidase from *Kluyveromices lactis* on silica and agarose; Comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*,4:313 – 327.

Goldstein, I.J. (1980). What should be called a lectin? *Nature*. 285: 66.

Hernández Cruz, P., Pérez Campos, E., Martínez, L., Ortiz, B.& Martínez, G (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de educación bioquímica UNAM*24: 21-27.

Iglesias, J.L., Lis, H. & Sharon, N(1982). Purification and properties of a D-galactose/N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Erythrina cristagalli* seeds. Eur. J. Biochem.123: 247–252.

Kaladas, P.M., Kabat, E., Iglesias, J.L., Lis, H. & Sharon, N (1982). Immunochemical Studies on the Combining Site of the D- galactose/N-acetyl-D-galactosamine specific lectin from *Erythrina cristagalli* seeds.Archives of biochemistry and biophysics 127: 624-637.

Krzeslak, A., Pomorski, L., Gaj, Z. & Lipinska, A. (2003). Differences in glycosylation of intracellular proteins between benign and malignant thyroid neoplasms. Cancer Lett. 196: 101 -107.

Lis, H.& Sharon, N. (1998) Lectins: Carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev. 98: 637-674.

Mäkelä, O. (1957). Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds.Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 3:1-133.

Manoj, N. & Suguna, K. (2001). Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. Protein Engineering 14: 735-745.

Mathews, C.K., Ahern, K.G. & Van Holde, K.E. (2002). Bioquímica 2ª Edición. Editado por Pearson, Capítulo 9.

Merril, C. (1990). Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology, edited by Deutscher, MP. Capítulo Gel staining techniques 182: 477-488.

Mikkola M, Toivonen S, Tamminen K, Alfthan K, Tuuri T, Satomaa T, Natunen J, Saarinen J, Tiittanen M, Lampinen M, Valmu L, Partanen J, & Otonkoski T (2012). Lectin from *Erythrina cristagalli* Supports Undifferentiated Growth and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells.

Mislovicova, D., Gemeiner, P., Kozarova, A & Kozar, T. (2009). Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. *Biologia* 64: 1-19, Section Cellular and Molecular Biology.

Nilsson, C. (2007). *Lectins: Analytical Technologies*, First edition. Editado por Carol Nilsson, ELSEVIER. Capítulos 3, 4 y 5.

Nowak, T., Haywood, P. & Barondes, S. (1976). Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68:650-657.

Plá, A., Alonso, E., Batista-Viera, F. & Franco Fraguas, L.(2003). Screening for carbohydrate-binding proteins in extracts of Uruguayan plants. *Brazilian J of Med. Biol. Res.* 36: 851-860.

Porath, J.&Ersson, B. (1973). in *Proceedings of the Symposium on New Approaches for Inducing Natural Immunity to Pyrogenic Organisms*(Robbins, J. B., Horton, R. E. & Drause, R. M., eds) 101 - 108, Winter Park, Florida.

Peumans, W.J. & Van Damme, E.J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109:347-352.

Rüdiger, H.& Rouge, P. (1998). Structure and function of plant lectin. *Carbohydr. Eur.* 23:16- 22.

Sharon, N & Lis, H. (1989). The lectins as cell recognition molecules. *Science* 246: 227-234.

Sharon, N. & Lis, H. (2007). en: *Lectins*. 2nd Edition, editado por Sharon, N & Lis, H. Springer. Capítulos 3, 4, 5, 6, 8 y 11.

Sharon, N. (2006). Atomic Basis of Protein–carbohydrate Interactions: An Overview. Edited by the Royal Chemical Society “Protein-Carbohydrate Interactions in Infectious Diseases”, 1-5.

Smith, P.K., Khron, R.I., Hermanson, G.F., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J.& Klent, D.C. (1986). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.

Sober, H.A. & Harte, R.A. (1968). *CRC Handbook of Biochemistry*, 2nd Edition CRC Press.

Turton, K., Natesh, R., Thiyagarajan, N., Chaddock, J., & Acharya, K. (2004). Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. *Glycobiology* 14: 923-929.

Van Damme, E., Peumans, E., Pusztai, A. & Bardocz, S. (1998). *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. Editado por John Wiley & Sons Ltd. Capítulos 1, 2 & 3.

Weis, W.I., Drickamer, K. & Hendrickson, W. (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360: 122.

Wu, AM., Wu, J.H., Tsai, M.S., Yang, Z., Sharon, N. & Herp, A. (2007) Differential affinities of *Erythrina cristagalli* lectin toward monosaccharides and polyvalent mammalian structural units. *Glycoconj. J.* 24: 591-604.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Padre por adoptarme, al Señor Jesús por su Favor y al Espíritu Santo por ser mi guía y consuelo.

Ha sido todo un privilegio para mí, de que la Dra Laura Franco Fraguas me haya aceptado como orientado en la realización de esta tesina. Gracias por su paciencia, dedicación e incansables horas de enseñanza y motivación.

A cada uno de los Docentes de la Cátedra de Bioquímica de Facultad de Química, por ayudarme en diferentes oportunidades.

A mi familia, a Ana Laura, hermanos en la fe y amigos, quienes me han dado aliento y ayuda para seguir por medio su amor.

*El que habita al abrigo del Altísimo
Morará bajo la sombra del Omnipotente.
Diré yo a Jehová: Esperanza mía, y castillo mío;
Mi Dios, en quien confiaré.
Salmo 91: 1-2*