

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Aproximación a la estructura
primaria de lectinas específicas para
el antígeno Tn e identificación de
nuevas lectinas específicas para
glucosa/manosa en semillas de
Salvia bogotensis y *Lepechinia
bullata*.**

Miriam Andrea Wilches Torres

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2017

Approximation to the primary structure of specific Tn antigen lectins and identification of new glucose / mannose specific lectins in *Salvia bogotensis* and *Lepechinia bullata* seeds.

**Aproximación a la estructura
primaria de lectinas específicas para
el antígeno Tn e identificación de
nuevas lectinas específicas para
glucosa/manosa en semillas de
Salvia bogotensis y *Lepechinia
bullata*.**

Miriam Andrea Wilches Torres

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Química

Directora:

PhD. Nohora Angélica Vega Castro

Línea de Investigación:

Lectinas de Lamiáceas

Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2017

IV Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

A mi hijo Santiago por ser mi energía y mi motor, por recordarme con su mirada que Dios existe!

En memoria del Profesor Gerardo Pérez

Agradecimientos

Agradezco a Dios, porque su presencia me inspira cada día.

A la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias y especialmente al departamento de Química, por la formación y la oportunidad de avanzar académicamente.

A Colciencias por la financiación del proyecto y por el apoyo económico para mi estudio.

Al Doctor Gerardo Pérez (Q.E.P.D.) por la oportunidad y la confianza que depositó en mí al aceptarme como integrante del Grupo de Investigación en Proteínas.

A la Doctora Nohora Angélica Vega por su dirección, por su invaluable apoyo y por ser un ejemplo como Maestra, como Científica y más que todo, como Mujer.

Al Doctor Édgar Antonio Reyes por su colaboración y formación, no solo en el ámbito académico sino profesional y personal.

Al Centre de Recherches sur les macromolécules Végétales (Cermav), Francia; Doctoras Anne Imberty y Anabelle Varrot, Doctor Serge Pérez, Investigadoras Emilie Gillon, Valerie Chazalet y Dorte Hundling, y a todo el grupo de glicobiología molecular y estructural por la colaboración, la acogida y los conocimientos brindados durante mi estadía en Grenoble.

Al Doctor Soorej Basheer por su invaluable colaboración, su interés en esta investigación, y principalmente por su apoyo y amistad.

Al Doctor José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales e investigador del GRIP, por el interés en este trabajo, y por su colaboración en la búsqueda e identificación de las especies vegetales.

A la Universidad Johns Hopkins, Departamento de Biofísica y Biofísica-química- Maryland (USA); Doctor Mario Amzel.

A mi esposo Juan Pablo Medina, por su paciencia y por seguir siendo mi cómplice incondicional, mi inspiración y mi motivación en los retos que me propongo. A Santiago, mi hijo, por darme el impulso y la energía para concluir esta etapa académica.

A mi papá Alirio Wilches, a mi mamá Clemencia Torres, a mis hermanas Laura y Diana, por ser el soporte en cada uno de los proyectos que emprendo.

X Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

Al grupo de investigación en proteínas -GRIP- especialmente a mis amigos y compañeros de investigación Edwin Reyes, Mónica Quintero, Andrea Cortés, Nury Vargas, César Machuca, Camilo Alvarado, Tania Cortázar, Nury Carreño y Zulma Casas, quienes hicieron de esta labor académica una experiencia de vida inolvidable. A Helenita por su colaboración y compañía.

A Katherine León y Harold Ardila por su apoyo y colaboración en momentos cruciales de esta investigación.

A la Universidad de Boyacá por su confianza y apoyo constante, especialmente a mis amigos Carolina Cipagauta y Germán Arias, quienes me acompañaron durante todo el proceso de realización de este proyecto. Al Departamento de Química y Bioquímica principalmente a Luis Carlos Garzón, Wilfred Espinosa, Darío Martín y William Osorio, por su interés, apoyo y colaboración para culminar esta fase.

A todas aquellas personas que creyeron en mí y que de una u otra forma, hicieron posible el desarrollo y culminación de este estudio.

Resumen

Las lectinas son proteínas que reconocen carbohidratos y están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las lectinas vegetales son una herramienta valiosa en el diagnóstico clínico debido al reconocimiento de carbohidratos específicos, por ejemplo el antígeno Tn (GalNAc-Ser/Thr), que se expone en algunas patologías como el cáncer.

Las lectinas de la familia Leguminosae son las más estudiadas, encontrando varias especies que reconocen el antígeno Tn. En contraste, en la familia Lamiaceae es escasa la información disponible. En ésta únicamente se ha reportado la estructura terciaria de la lectina de *Salvia miltiorrhiza* y de *Glechoma hederácea*. El Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP) ha caracterizado parcialmente las lectinas de *Salvia palifolia*, *Hyptis mutabilis*, *Lepechinia bullata* (LLb-I) y *Salvia bogotensis* (LSBo-I), pertenecientes también a la familia Lamiaceae.

Este trabajo continuó con la caracterización de LLb-I y realizó una aproximación a la estructura primaria de LSBo-I, siendo ambas especies endémicas en Colombia. Por otra parte se trabajó en la caracterización bioquímica de LLb-II y LSBo-II.

Para la purificación se realizó cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad sobre diferentes ligandos. LLb-I aglutinó preferencialmente eritrocitos T (Gal β 1,3 GalNAc-O-Ser / Thr) y Tn (GalNAc-O-Ser / Thr) y presentó un punto isoeléctrico (pI) cercano a 8.5. En electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante y reductora (SDS - PAGE) se observaron bandas alrededor de 28, 48 y 93 kDa; la especie de 93 kDa no logró disociarse completamente a pesar de ser sometida a diferentes condiciones de reducción.

En LSBo-I se realizó digestión trípica y secuenciación de fragmentos por espectrometría de masas en tándem obteniéndose una secuencia parcial con 62% de cobertura sobre el total esperado, y presentó un modelo tridimensional similar al de lectinas tipo Leguminosa.

XII Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

LLb-II y LSBo-II aglutinaron eritrocitos A, T y Tn, y presentaron características bioquímicas similares a lectinas de Leguminosae específicas por manosa/glucosa. Por primera vez se reporta en especies de la familia Lamiaceae la presencia de más de una lectina.

Palabras clave: Lectina vegetal, *Lepechinia bullata*, *Salvia bogotensis*, Familia Lamiaceae, Antígenos T y Tn, Glucosa / Manosa, Purificación de proteínas.

Abstract

Lectins are proteins that recognize carbohydrates, are widely distributed in nature. Vegetable lectins are a valuable tool in clinical diagnosis due to the recognition of specific carbohydrates, for example the Tn antigen, which is exposed in some pathologies such as cancer.

Lectins of the Leguminosae family are the most studied, finding several species that recognize Tn antigen. In contrast, in the Lamiaceae family, the available information is limited. In this, just the tertiary structure of *Salvia miltiorrhiza* lectin and *Glechoma hederacea* lectin has been reported. The Protein Research Group (PRG) has partially characterized the lectins from *Salvia palifolia*, *Hyptis mutabilis*, *Lepechinia bullata* (LLb-I) and *Salvia bogotensis* (LSBo-I), which both belong to the Lamiaceae family.

This work continued with LLb-I characterization and performed an approximation to the primary structure from LSBo-I, being endemic species in Colombia. On the other hand, we worked on biochemical characterization of LLb-II and LSBo-II.

Anion exchange chromatography and affinity chromatography on different ligands were performed for lectins purification. LLb-I preferentially agglutinated T and Tn erythrocytes and presented an isoelectric point near to 8.5. In SDS-PAGE 28, 48 and 93 kDa bands were observed. The last one species did not completely dissociate despite being subjected to different reduction conditions.

Tryptic digestion and fragment sequencing by tandem mass spectrometry were performed in LSBo-I, obtaining a partial sequence with 62% coverage over the expected total. It presented a three-dimensional model similar to the Leguminous type lectins.

LLb-II and LSBo-II agglutinated A, T and Tn erythrocytes, and presented biochemical characteristics similar to mannose / glucose-specific Leguminosae lectins. For the first time is reported the presence of more than one lectin in Lamiaceae species.

Keywords: Vegetal lectin, *Lepechinia bullata*, *Salvia bogotensis*, Lamiaceae family, T and Tn antigens, Glucose / Mannose, Protein purification.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	XI
Lista de figuras	XVIII
Lista de tablas	XXII
Lista de abreviaturas	XXIV
Introducción	1
1. Justificación.....	7
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo general	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. Marco teórico	13
3.1 Generalidades sobre lectinas	13
3.2 Lectinas animales.....	15
3.3 Lectinas vegetales.....	16
3.3.1 Lectinas de la familia Leguminosae	19
3.3.2 Lectinas de la familia Lamiaceae	24
4. Metodología.....	31
4.1 Fase I. Caracterización bioquímica de la lectina de <i>Lepechinia bullata</i> (LLb-I) y comparación con otras lectinas específicas para el antígeno Tn.....	31
4.1.1 Colección de material vegetal	31
4.1.2 Preparación de extractos de proteína total a partir de semillas	32
4.1.3 Cromatografía de Intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex para los extractos proteicos.....	33
4.1.4 Cromatografía de afinidad - Síntesis de soportes utilizando diferentes monosacáridos	34
4.1.5 Caracterización de las fracciones de proteína obtenidas durante las etapas de extracción y purificación de las lectinas	37
4.1.6 Determinación del punto isoeléctrico	41
4.1.7 Determinación de estabilidad (Thermal Shift Assay).....	41
4.1.8 Determinación del reconocimiento de carbohidratos por parte de la lectina	42
4.2 Fase II. Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de la lectina de <i>Salvia bogotensis</i> (LSBo-I), específica para los antígenos T/Tn.....	42

4.2.1	Extracción y purificación de la lectina.....	42
4.2.2	Obtención de la secuencia amino terminal.....	44
4.2.3	Digestión enzimática de la lectina en gel de poliacrilamida.....	45
4.2.4	Obtención de la secuencia de los péptidos mediante Cromatografía Líquida – Espectrometría de masas en tándem (LCMS/MS).....	46
4.2.5	Aproximación a la estructura terciaria de LSBo-I.....	49
4.3	Fase III. Ensayos para la obtención de una lectina recombinante de LLb-I....	51
4.3.1	Colección de material vegetal.....	51
4.3.2	Extracción de ARN a partir de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	51
4.3.3	Síntesis de cDNA.....	53
4.3.4	Amplificación de fragmentos de ADN.....	54
4.3.5	Secuenciación del ADN amplificado.....	56
4.4	Fase IV. Purificación y caracterización de nuevas lectinas en semillas de <i>Salvia bogotensis</i> y <i>Lepechinia bullata</i>	57
4.4.1	Cromatografía de afinidad.....	57
4.4.2	Determinación del punto isoeléctrico.....	61
4.4.3	Detección de glicoproteínas.....	61
4.4.4	Obtención de la secuencia amino terminal.....	62
5.	Resultados y análisis.....	63
5.1	Caracterización bioquímica de la lectina de <i>Lepechinia bullata</i> (LLb-I) y comparación con otras lectinas específicas para el antígeno Tn.....	63
5.1.1	Extracción y purificación de la lectina.....	63
5.1.2	Determinación de la estabilidad térmica de LLb-I mediante TSA.....	83
5.1.3	Título de eritroaglutinación para LLb-I.....	86
5.1.4	Inhibición de eritroaglutinación por diferentes azúcares para LLb-I.....	87
5.2	Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de la lectina de <i>Salvia bogotensis</i> (LSBo-I), específica para el antígeno T/Tn.....	94
5.2.1	Extracción y purificación de la lectina.....	94
5.2.2	Determinación parcial de la secuencia de aminoácidos de la lectina de <i>Salvia bogotensis</i> con reconocimiento del antígeno Tn/T (LSBo-I).....	103
5.3	Ensayos preliminares para la obtención de LLb-I recombinante.....	124
5.3.1	Extracción de ARN a partir de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	125
5.3.2	Amplificación de fragmentos de ADN.....	127
5.3.3	Secuenciación del ADN amplificado.....	133
5.4	Purificación y caracterización de nuevas lectinas en semillas de <i>Salvia bogotensis</i> y <i>Lepechinia bullata</i>	135
5.4.1	Cromatografía de afinidad con diferentes ligandos.....	135
5.4.2	Purificación de lectinas con reconocimiento por manosa.....	137
5.4.3	Determinación del punto isoeléctrico.....	153
5.4.4	Detección de glicoproteínas.....	155
5.4.5	Obtención de la secuencia amino terminal de las lectinas purificadas.....	156
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	158
6.1	Conclusiones.....	158
6.2	Recomendaciones.....	161
A.	Anexo: Cuantificación de proteína por el método del ácido bicinónico (BCA) (Smith et al, 1985).....	164

B.	Anexo: Electroforesis en gel de poliacrilamida por el método de Laemmli.....	165
C.	Anexo: Electroforesis en gel de poliacrilamida por el método de Schägger y Von Jagow.....	166
D.	Anexo: Isoelectroenfoque.....	167
E.	Anexo: Transferencia a membrana de PVDF.....	168
F.	Anexo: Detección de glicoproteínas en membrana de nitrocelulosa.....	169
G.	Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de LLb-I.	171
H.	Anexo: Control de elución y de funcionalidad del soporte N-acetilgalactosamina-Sepharose 4B.....	173
I.	Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de la lectina de LLb-II.....	174
J.	Anexo: Péptidos trípticos antes de eliminar redundancia.....	176
K.	Anexo: Especies de Leguminosas que presentaron mayor identidad con algunos péptidos trípticos de LSBo-I.....	178
L.	Anexo: Especies de Lamiáceas que presentaron mayor identidad con algunos péptidos trípticos de LSBo-I.....	179
M.	Anexo: Secuencia peptídica de la lectina de <i>Glechoma hederácea</i> (Gleheda) 180	
N.	Anexo: Secuencia peptídica de la lectina de <i>Salvia miltiorrhiza</i>	181
O.	Anexo: Alineamiento del fragmento de ADN amplificado con los primers "Can" para <i>Lepechinia bullata</i>	182
P.	Anexo: Alineamiento del fragmento de ADN amplificado con los primers "Craty" para <i>Lepechinia bullata</i>	183
Q.	Anexo: Alineamiento del fragmento de ADN amplificado con los primers "Dgf mn" para <i>Lepechinia bullata</i>	184
R.	Anexo: Control de elución y de funcionalidad del soporte Manosa – Sepharose 4B.....	185
S.	Anexo: Control de elución y de funcionalidad del soporte Concanavalina A – Sepharose 4B.....	186
T.	Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de la lectina de LLb-II.....	187
U.	Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de LSBo-II	189

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1: Clasificación de las lectinas según el sitio de reconocimiento a carbohidrato.	18
Figura 3-2: Clasificación según familias de lectinas.....	18
Figura 3-3: Estructura tridimensional de Concanavalina A.	20
Figura 3-4: Modelo de reconocimiento de GalNAc por la lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>	23
Figura 4-1: Proceso realizado para la obtención de extractos proteicos a partir de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	33
Figura 4-2: Estructura de algunos oligosacáridos expuestos en la membrana de eritrocitos, utilizados en los ensayos de aglutinación con lectinas de <i>Lepechinia bullata</i>	38
Figura 4-3: Proceso realizado para la obtención de extractos proteicos a partir de semillas de <i>Salvia bogotensis</i>	44
Figura 4-4: Síntesis del proceso de obtención de las lectinas presentes en <i>Lepechinia bullata</i> y en <i>Salvia bogotensis</i>	60
Figura 5-1: Espécimen de <i>Lepechinia bullata</i> encontrado en la vía Arcabuco-Gachantivá (Boyacá).....	63
Figura 5-2: Semillas de <i>Lepechinia bullata</i> en distinto estado de maduración.	64
Figura 5-3: Eritroaglutinación de extractos proteicos de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	67
Figura 5-4: SDS-PAGE de los extractos proteicos de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	68
Figura 5-5: Perfil cromatográfico de intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex para el extracto proteico de <i>Lepechinia bullata</i>	69
Figura 5-6: Eritroaglutinación de fracciones obtenidas por intercambio aniónico a partir de extractos proteicos de <i>Lepechinia bullata</i>	71
Figura 5-7: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico para <i>Lepechinia bullata</i>	72
Figura 5-8: Perfil cromatográfico de intercambio aniónico para el extracto proteico de <i>Lepechinia bullata</i>	73
Figura 5-9: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico para <i>Lepechinia bullata</i> , mediante FPLC.	74
Figura 5-10: Perfil cromatográfico de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B, para <i>Lepechinia bullata</i>	76
Figura 5-11: Eritroaglutinación de LLb-I.....	77
Figura 5-12: SDS-PAGE de LLb-I obtenida por cromatografía de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B.	79
Figura 5-13: SDS-PAGE de LLb-I, sometida a diferentes condiciones reductoras.....	80
Figura 5-14: Isoelectroenfoque de LLb-I.....	81
Figura 5-15: Perfil cromatográfico de afinidad sobre GalNAc–Sepharose 4B, para <i>Lepechinia bullata</i>	83
Figura 5-16: Comportamiento típico de una proteína sometida al ensayo TSA.	83

Figura 5-17:	Resultados de termoestabilidad mediante TSA para LLb-I.	84
Figura 5-18:	Título de aglutinación para LLb-I.....	86
Figura 5-19:	Inhibición de eritroaglutinación para LLb-I, utilizando diferentes carbohidratos.	87
Figura 5-20:	Estructura de oligosacáridos presente en Fetuína (Baenziger y Fiete, 1979).	88
Figura 5-21:	Estructuras glicosídicas reconocidas por LLb-I.	92
Figura 5-22:	Espécimen de <i>Salvia bogotensis</i>	94
Figura 5-23:	Semillas de <i>Salvia bogotensis</i> maduras, antes y después de ser trituradas.	95
Figura 5-24:	Eritroaglutinación del extracto proteico de semillas de <i>Salvia bogotensis</i>	96
Figura 5-25:	SDS-PAGE del extracto proteico de semillas de <i>Salvia bogotensis</i>	97
Figura 5-26:	Perfil cromatográfico de intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex para el extracto proteico de <i>Salvia bogotensis</i>	98
Figura 5-27:	Eritroaglutinación de fracciones obtenidas por intercambio aniónico a partir de extractos proteicos de <i>Salvia bogotensis</i>	98
Figura 5-28:	SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico para <i>Salvia bogotensis</i>	99
Figura 5-29:	Perfil cromatográfico de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B, para <i>Salvia bogotensis</i>	100
Figura 5-30:	SDS-PAGE de LSBo-I obtenida por cromatografía de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B para <i>Salvia bogotensis</i>	101
Figura 5-31:	Resultados de termoestabilidad mediante TSA para LSBo-I.....	102
Figura 5-32:	SDS-PAGE de LSBo-I. Banda transferida a membrana PVDF.	103
Figura 5-33:	Alineamiento de secuencias de aminoácidos para las lectinas de <i>Salvia miltiorrhiza</i> y <i>Glechoma hederacea</i>	107
Figura 5-34:	Alineamiento de péptidos trípticos de LSBo-I contra la secuencia de la lectina de <i>Glechoma hederácea</i>	108
Figura 5-35:	Alineamiento de péptidos trípticos de LSBo-I contra la secuencia de la lectina de <i>Salvia miltiorrhiza</i>	109
Figura 5-36:	Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida de LSBo-I, Gleheda y la lectina de <i>Salvia miltiorrhiza</i>	109
Figura 5-37:	Secuencia parcial de LSBo-I.....	110
Figura 5-38:	Acoplamiento molecular de la lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i> con el antígeno Tn.	112
Figura 5-39:	Acoplamiento molecular de Amarantina con el antígeno T.	114
Figura 5-40:	Acoplamiento molecular de Gleheda con el antígeno Tn.	115
Figura 5-41:	Modelo de LSBo-I obtenido por I-Tasser.	115
Figura 5-42:	Alineamiento tridimensional de las lectinas de <i>Salvia bogotensis</i> -I, <i>Salvia miltiorrhiza</i> -II y <i>Vicia villosa</i> Isolectina B ₄ utilizando UCSF Chimera.....	117
Figura 5-43:	Modelo del sitio de unión a carbohidrato en LSBo-I obtenido por I-Tasser.	119
Figura 5-44:	Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y Antígeno T obtenido por Autodock Vina.	120
Figura 5-45:	Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y Antígeno Tn obtenido por Autodock Vina.	121
Figura 5-46:	Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y galactosa obtenido por Autodock Vina.	122
Figura 5-47:	Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y N-acetilgalactosamina obtenido por Autodock Vina.	122

Figura 5-48:	Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y Tn-péptido obtenido por Autodock Vina.	123
Figura 5-49:	Semillas de <i>Lepechinia bullata</i> en estado inmaduro.	125
Figura 5-50:	Electroforesis del ARN obtenido a partir de semillas de <i>Lepechinia bullata</i> con diferentes protocolos de extracción.	126
Figura 5-51:	Secuencia consenso obtenida por T-coffee, después del alineamiento de las lectinas de <i>Salvia miltiorrhiza</i> y <i>Glechoma hederacea</i>	129
Figura 5-52:	Electroforesis de los fragmentos de ADN de <i>Lepechinia bullata</i> amplificados con los distintos juegos de primers ensayados.	130
Figura 5-53:	Electroforesis de los fragmentos de ADN de <i>Lepechinia bullata</i> amplificados con los primers diseñados sobre el amino terminal de LSBo-I.	131
Figura 5-54:	Electroforesis de los fragmentos de ADN de <i>Lepechinia bullata</i> reamplificados con los primers diseñados sobre el amino terminal de LSBo-I.	132
Figura 5-55:	Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “Can”, diseñados a partir de la lectina de <i>Canavalia brasiliens</i>	133
Figura 5-56:	Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “Craty”, diseñados a partir de la lectina de <i>Canavalia gladiata</i>	133
Figura 5-57:	Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “Dgf mn”, diseñados a partir de la lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>	134
Figura 5-58:	Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “LSBo 3”, diseñados a partir de la lectina de <i>Salvia bogotensis</i>	134
Figura 5-59:	Columnas para cromatografías de afinidad de las fracciones retenida y no retenida por intercambio iónico, de <i>Lepechinia bullata</i>	136
Figura 5-60:	SDS-PAGE de la fracción retenida por cromatografía de afinidad sobre manosa – agarosa para <i>Lepechinia bullata</i>	137
Figura 5-61:	Cromatografía de afinidad sobre Sephacryl para LLb-II.	138
Figura 5-62:	Cromatografía de afinidad sobre Sephacryl para LSBo-II.	138
Figura 5-63:	SDS-PAGE de LLb-II y LSBo-II obtenidas por cromatografía de afinidad sobre Sephacryl.	139
Figura 5-64:	Cromatografía de afinidad sobre Manosa – Sepharose 4B para LLb-II.	140
Figura 5-65:	Cromatografía de afinidad sobre Manosa – Sepharose 4B para LSBo-II.	141
Figura 5-66:	SDS-PAGE de LLb-II y LSBo-II obtenidas por cromatografía de afinidad sobre manosa – Sepharose 4B.	142
Figura 5-67:	Cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B para LLb-II. ..	144
Figura 5-68:	Cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B para LSBo-II.	144
Figura 5-69:	Eritroaglutinación de la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, para LLb-II.	146
Figura 5-70:	Eritroaglutinación de la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, para la lectina de LSBo-II.	146
Figura 5-71:	SDS-PAGE de LLb-II y LSBo-II obtenidas por cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B.	148
Figura 5-72:	SDS-PAGE de LLb-II eluida con Gly 50 mM pH 3.0 en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, sometida a diferentes condiciones reductoras.	150
Figura 5-73:	SDS-PAGE de LSBo-II eluida con Gly 50 mM pH 3.0 en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, sometida a diferentes condiciones reductoras.	150
Figura 5-74:	Isoelectroenfoque de LLb-II, obtenida por cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B.	154
Figura 5-75:	Isoelectroenfoque de LSBo-II, obtenida por cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B.	154

Figura 5-76: Membrana de nitrocelulosa, tratada para la identificación de glicoproteínas en LLb-II y LSBo-II, obtenidas por cromatografía de afinidad sobre Con A–Sephrose 4B.
155

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1: Primers utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN proveniente de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	55
Tabla 4-2: Programa de PCR para la amplificación de fragmentos de ADN proveniente de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	56
Tabla 5-1: Cuantificación y actividad eritroaglutinante de los extractos proteicos obtenidos a partir de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	66
Tabla 5-2: Actividad aglutinante sobre eritrocitos humanos de las fracciones obtenidas por intercambio iónico.....	70
Tabla 5-3: Actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo de las fracciones obtenidas por intercambio iónico.....	71
Tabla 5-4: Porcentajes de acople de aMSB a Sepharose 4B.....	75
Tabla 5-5: Actividad eritroaglutinante de LLb-I.....	77
Tabla 5-6: Inhibición de la actividad eritroaglutinante de lectinas de Lamiáceas que reconocen el antígeno Tn.	90
Tabla 5-7: Propiedades moleculares de lectinas con reconocimiento del antígeno Tn, encontradas en Lamiáceas.	93
Tabla 5-8: Cuantificación y actividad eritroaglutinante de los extractos proteicos obtenidos a partir de semillas de <i>Salvia bogotensis</i>	95
Tabla 5-9: Actividad eritroaglutinante de las fracciones obtenidas por intercambio iónico a partir de extractos proteicos de <i>Salvia bogotensis</i>	99
Tabla 5-10: Actividad eritroaglutinante de LSBo-I.....	101
Tabla 5-11: Alineamiento de secuencias amino terminales de lectinas vegetales con LSBo-I.	104
Tabla 5-12: Secuencia de péptidos obtenidos con tripsina por LC/MS/MS de LSBo-I... ..	105
Tabla 5-13: Aminoácidos encontrados en la secuencia parcial deducida para LSBo-I	111
Tabla 5-14: Aminoácidos identificados en el sitio de unión de LSBo-I, que presentan interacción con los ligandos ensayados.....	124
Tabla 5-15: Comparación de las características del ARN obtenido con diferentes kits.. ..	126
Tabla 5-16: Primers utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN proveniente de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>	128
Tabla 5-17: Actividad eritroaglutinante de la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre Sephacryl, para LLb-II y LSBo-II.....	139
Tabla 5-18: Actividad eritroaglutinante de las fracciones retenidas en cromatografía de afinidad sobre Manosa – Sepharose 4B, para LLb-II y LSBo-II.....	142
Tabla 5-19: Actividad eritroaglutinante de las fracciones retenidas en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, para LLb-II y LSBo-II.....	145

Tabla 5-20: Cantidad de LLb-II y LSBo-II purificada a partir de 50 g de semillas	152
Tabla 5-21: Secuencia amino terminal de Lectinas de la tribu <i>Diocleae</i> (tomada y modificada de Cavada et al., 2006)	156
Tabla 5-22: Propiedades moleculares de las lectinas de Lamiáceas LLb-II, LSBo-II y otras lectinas de Leguminosas que reconocen manosa.	157

Lista de abreviaturas

Abreviatura Término

<i>ABTS</i>	Azino-bis 2.2 (ácido 3-etilbenztiazoline-6-sulfónico)
<i>Ala</i>	Alanina
<i>ADN</i>	Ácido Desoxiribonucleico
<i>ARN</i>	Ácido Ribonucleico
<i>Asn</i>	Asparagina
<i>Asp</i>	Ácido aspártico
<i>Arg</i>	Arginina
<i>AFP</i>	α Fetoproteína
<i>aMSB</i>	Asialo Mucina Submaxilar Bovina
<i>aMSO</i>	Asialo Mucina Submaxilar Ovina
<i>Bp</i>	Pares de bases
<i>BCA</i>	Ácido bicinconínico
<i>BLAST</i>	Herramienta básica para al búsqueda de alineamientos locales
<i>BSA</i>	Albúmina Bovina de Suero
<i>CA125, CA19-0, CA15.3</i>	Antígenos que funcionan como marcadores tumorales inespecíficos de cáncer de seno, ovario y gastrointestinal entre otros
<i>CAPS</i>	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico
<i>cDNA</i>	ADN complementario
<i>CEA</i>	Antígeno Carcinoembrionario
<i>CERMAV</i>	Centre de Reserches sur les Macromolécules Végétales
<i>CID</i>	Disociación inducida por collision
<i>Con A</i>	Concanavalina A

Abreviatura Término

<i>Cys</i>	Cisteína
<i>DAB</i>	3'3'-diaminobenzidina
<i>DEAE</i>	Dietilaminoetilo
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
<i>dNTP</i>	Desoxinucleótido trifosfatado
<i>dT</i>	Desoxi Timina
<i>DTT</i>	Ditiotreitol
<i>EDC</i>	N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato
<i>ELLSA</i>	Enzyme Linked Lectino-Sorbent Assay
<i>EM</i>	Espectrometría de Masas
<i>ESI-EM</i>	Espectroscopía de Masas – Ionización por Electrospray
<i>FAC</i>	Cromatografía Frontal de Afinidad
<i>FPLC</i>	Cromatografía líquida de rápida resolución
<i>FT</i>	Transformada de Fourier
<i>Fuc</i>	Fucosa
<i>Gal</i>	Galactosa
<i>Glc</i>	Glucosa
<i>GalNAc</i>	N-acetilgalactosamina
<i>GlcNAc</i>	N-acetilglucosamina
<i>Gln</i>	Glutamina
<i>Glu</i>	Ácido glutámico
<i>Gly</i>	Glicina
<i>GRIP</i>	Grupo de Investigación en Proteínas
<i>His</i>	Histidina
<i>Ile</i>	Isoleucina
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta resolución
<i>kDa</i>	Kilo Daltons
	Cromatografía Líquida acoplada a
<i>LCMS</i>	Espectrómetro de Masas

Abreviatura Término

<i>LCMS-IT-TOF</i>	Cromatografía Líquida acoplada a espectrómetro de Masas – Trampa de iones – Tiempo de Vuelo
<i>Le^X-Le^X</i>	Antígeno Lewis X-Lewis X
<i>Le^Y</i>	Antígeno Lewis Y
<i>Leu</i>	Leucina
<i>LSBo-I</i>	Lectina I de <i>Salvia bogotensis</i>
<i>LSBo-II</i>	Lectina II de <i>Salvia bogotensis</i>
<i>LLb-I</i>	Lectina I de <i>Lepechinia bullata</i>
<i>LLb-II</i>	Lectina II de <i>Lepechinia bullata</i>
<i>LTQ</i>	Linear Trap Quadrupole
<i>Lys</i>	Lisina
<i>mA</i>	Mili Amperios
<i>MALDI-MS</i>	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectroscopy
<i>Man</i>	Manosa
<i>mARN</i>	ARN mensajero
<i>MBP</i>	Proteína de unión a manosa
<i>MES</i>	Ácido 4-morfolinetanosulfónico sal hemisódica
<i>Met</i>	Metionina
<i>mL</i>	Mililitros
<i>mM</i>	Milimolar
<i>Mr</i>	Masa relativa
<i>MS</i>	Espectroscopía de Masas
<i>MSB</i>	Mucina Submaxilar Bovina
<i>MSO</i>	Mucina Submaxilar Ovina
<i>MIPS</i>	Selección del Ión Precursor Monoisotópico
<i>NCBI</i>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
<i>NeuAcα</i>	Ácido siálico
<i>ng</i>	Nanogramos

Abreviatura Término

<i>NHS</i>	<i>N-hidroxisuccinimida</i>
<i>nL</i>	Nanolitros
<i>nm</i>	Nanómetros
<i>nM</i>	Nanomolar
<i>PAGE</i>	Electroforesis en gel de Poliacrilamida
<i>PBS</i>	Buffer Fosfato Salino
<i>PCR</i>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<i>Phe</i>	Fenilalanina
<i>PM</i>	Peso Molecular
<i>Ppm</i>	Partes por millón
<i>Pro</i>	Prolina
<i>PVDF</i>	Fluoruro de Polivinilideno
<i>RT-PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa – Transcripción Reversa
<i>SDS</i>	Dodecil sulfato de Sodio
<i>Ser</i>	Serina
<i>sTn</i>	Antígeno sialil Tn
<i>SLe^A</i>	Antígeno silalil Lewis A
<i>SLe^X</i>	Antígeno silalil Lewis X
<i>T</i>	Antígeno T (Gal β 1,3 GalNAc-O-Ser/Thr)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TBS</i>	Buffer Tris Salino
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético
<i>Thr</i>	Treonina
<i>Tm</i>	Temperatura de melting
<i>Tn</i>	Antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr)
<i>TPCK</i>	L-(tosilamido-2-fenil) etil chlorometil cetone
<i>Trp</i>	Triptófano
<i>Tyr</i>	Tirosina
<i>V</i>	Valina
<i>VVLB₄</i>	Isolectina B ₄ de <i>Vicia villosa</i>
<i>V</i>	Voltios

XX Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el
VIII antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en
semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

Abreviatura Término

W Watios

Introducción

Las lectinas son un grupo de proteínas con especificidad en el reconocimiento de carbohidratos. Son diferentes a los anticuerpos, a proteínas transportadoras de mono y oligosacáridos libres, y a las enzimas encargadas de la biosíntesis de oligosacáridos (Rüdiger y Gabius, 2009). Su estudio comenzó hace más de cien años debido al efecto aglutinante sobre diversas células como eritrocitos, linfocitos, plaquetas, espermatozoides y células tumorales, entre otras (Gabius, 2000), por lo tanto se han convertido en moléculas valiosas para el diagnóstico y pronóstico de patologías asociadas con alteraciones en la glicosilación celular, como la encontrada en diferentes tipos de cáncer (Ghazarian et al., 2011; André et al., 2015; Kudelka et al., 2015).

Estas proteínas están distribuidas ampliamente en la naturaleza encontrándose en virus, bacterias, hongos, plantas y animales. Las lectinas de origen animal han sido involucradas con funciones de chaperonas, direccionamiento intracelular de glicoconjugados, transporte intracelular, mediación de endocitosis, reconocimiento de glicanos foráneos, inducción o supresión de moléculas efectoras, regulación del crecimiento celular, inducción de apoptosis, interacciones célula – célula, entre otras (Ambrosi et al., 2005). Las lectinas vegetales han sido relacionadas con mecanismos de defensa contra insectos y microorganismos (De Schutter y Van Damme, 2015; Dang y Van Damme, 2015; Macedo et al., 2015; Raja et al., 2016; Lima et al., 2016), almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, procesos de regulación fisiológica y de estimulación mitogénica (Gabius et al., 2002; Maciel et al., 2004; Martínez, 2009; Dan y Ng, 2016).

Actualmente las lectinas vegetales se han definido como una superfamilia de proteínas que participan en la defensa de plantas contra el ataque de patógenos, predadores (Lanoo y Van Damme, 2014; Casas et al., 2016) e insectos fitófagos (Vandenborre et al., 2011).

También se han relacionado con la respuesta del “Sistema inmune” de plantas y animales (De Schutter y Van Damme, 2015).

Las lectinas han sido una herramienta importante en los estudios de purificación y caracterización estructural de los oligosacáridos presentes en glicoconjugados (André et al., 2015; Bojarová y Kren, 2016). La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más frecuente en las proteínas, ésta ocurre por la unión de una o más cadenas de oligosacáridos al polipéptido, confiriendo a las proteínas diferentes cualidades estructurales y funcionales (Van Damme, 2011).

Actualmente uno de los campos de más rápido crecimiento en bioquímica y biología molecular es la glicómica, término que hace referencia al estudio de la función de los carbohidratos y cómo estos pueden regular procesos biológicos que van desde la coagulación hasta la infección viral y bacteriana, actuando en diferentes tipos de células. Los glicoconjugados expuestos en las superficies celulares desempeñan funciones de reconocimiento, adhesión y comunicación celular. En células alteradas estas interacciones están relacionadas con tumorigénesis, progresión de tumor y metástasis (Kannagi et al., 2004; Cazet et al., 2010; Syed et al., 2016), lo que ha llevado al desarrollo de vacunas basadas en carbohidratos asociados a células cancerosas (Cipolla et al., 2008; Syed et al., 2016). Durante los procesos de diferenciación celular y transformación maligna de células cancerosas, la biosíntesis de oligosacáridos no es igual que en las células normales (Sharon y Lis, 1989; Hakomori, 1996; Satomaa et al., 2009; Wang et al., 2013, Pinho y Reis, 2015). Otros estudios han mostrado que hay una disminución en el crecimiento de células cancerosas y por lo tanto un mejor pronóstico de vida al utilizar lectinas durante el tratamiento de la enfermedad (Springer, 1997; Kanev y Bakar, 2016).

La glicopatología estudia la alteración del proceso de glicosilación de proteínas a nivel celular, el cual puede modificarse aberrantemente ante diversas situaciones fisiológicas y patológicas. En este contexto las lectinas han sido un instrumento valioso como moléculas de biorreconocimiento y han sido clave en el estudio de este comportamiento (Ambrosi et al., 2005; Dan et al., 2015; Yamamoto et al., 2016; Syed et al., 2016). La distribución, interacciones e importancia de las lectinas en el campo biomédico han sido ampliamente documentadas (Lis y Sharon 1986; Van Damme et al., 1998; Sharon y Lis, 2001; Sharon y

Lis, 2005; Kuno et al., 2010; Goldsetin y Poretz, 2012; André et al.; 2015, Bojarová y Kren, 2016) y esto ha permitido estudiar los glicanos a nivel estructural y funcional.

De otro lado, algunas lectinas vegetales también han sido reportadas como moléculas inhibitoras de la infección del VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y de otros virus; este comportamiento es debido a la capacidad que tienen las lectinas de reconocer y unirse específicamente a glicoproteínas expuestas en la envoltura de virus, bloqueando así la unión que debe darse con la célula hospedera (Akkouh et al., 2015).

Teniendo en cuenta que es importante conocer la especificidad de lectinas, se han desarrollado métodos para determinar las constantes afinidad de las interacciones proteína-carbohidrato utilizando Cromatografía Frontal de Afinidad (FAC) (Hirabayashi, 2003; Nakamura-Tsuruta et al., 2007); sin embargo muchas de las lectinas vegetales pueden identificar un rango limitado de glicanos, o por el contrario, reconocen una gran variedad, disminuyendo su especificidad. En la actualidad se está desarrollando la ingeniería de lectinas para obtener moléculas con especificidades y afinidades más definidas por los carbohidratos. Algunos de los métodos que permiten realizar las modificaciones en las lectinas incluyen mutagénesis dirigida y aleatoria, y por lo tanto es importante realizar estudios previos de secuencia de la proteína o del gen (Hu et al., 2015).

Las lectinas presentes en las semillas de diferentes especies de la familia Leguminosae (Leguminosas) han sido ampliamente estudiadas tanto a nivel estructural como a nivel funcional (Rini, 1995; Sharon y Lis, 2003; Goldstein y Poretz, 2012; Santos et al., 2014; Nascimento et al., 2016), mientras que las lectinas pertenecientes a la familia Lamiaceae (Lamiáceas, Labiadas) cuentan con escasos estudios que describan su estructura y función. Hasta el momento se ha reportado la caracterización parcial de las lectinas de *Salvia sclarea* (Piller et al., 1986; Medeiros et al., 2000; Wu, 2005), *Moluccella laevis* (Lis et al., 1988; Duk et al., 1992; Lis y Sharon, 1994), *Salvia palifolia*, *Hyptis mutabilis* (Filgueira, 2002; Filgueira y Pérez, 2013), *Lepechinia bullata* (LLb) (Sanabria, 1999; Rojas, 2004; Quintero, 2006), *Salvia bogotensis* (LSBo) (Vega, 2004; Vega y Pérez, 2006), Gleheda (Wang et al., 2003a) y *Salvia miltiorrhiza* (Wenping et al., 2015). La caracterización bioquímica de la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I) mostró diferencias apreciables con los datos publicados para *Salvia sclarea* (Medeiros et al., 2000); aunque

las dos lectinas reconocen el antígeno Tn (GalNAc α -Ser/Thr). Las propiedades moleculares de la LLb-I fueron similares a las de LSBo-I (Wilches et al., 2012; Wiches et al., sometido), incluso en el reconocimiento por los antígenos T y Tn.

El estudio de estas lectinas es importante ya que poseen la habilidad de reconocer antígenos que normalmente se encuentran enmascarados en la superficie celular y están asociados con una gran variedad de carcinomas (Springer, 1984 y 1997; Lisowska, 1995; Cao et al., 1996; Kishikawa et al., 1999; Ju et al., 2011 y 2013; Kudelka et al., 2015). Para las lectinas LSBo-I y LLb-I no se cuenta aún con información sobre su estructura primaria, lo que dificulta la comprensión de sus mecanismos de acción a nivel molecular y el estudio de las interacciones con los carbohidratos. Este trabajo se enfocó en la realización de estudios para determinar la secuencia de aminoácidos de lectinas que reconocen los antígenos T y Tn, así como la purificación de nuevas lectinas a partir de semillas de *Lepechinia bullata* y de *Salvia bogotensis*, dos especies endémicas pertenecientes a la familia de las Lamiáceas.

1. Justificación

El desarrollo de enfermedades neoplásicas y de otras patologías está usualmente asociado con cambios en la estructura de los carbohidratos expuestos en la superficie celular y que conforman las glicoproteínas presentes en los fluidos biológicos. Debido a que funciones fisiológicas de importancia en la célula dependen del reconocimiento de oligosacáridos específicos, las alteraciones en glicosilación sirven como marcadores en el estudio de la patogénesis de transformaciones neoplásicas.

Con las lectinas se han realizado estudios para investigar los cambios de glicosilación y así entender el significado biológico y patológico de estas modificaciones. Los antígenos sirven como marcadores tumorales y para el laboratorio clínico representan una poderosa herramienta, útil en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con cáncer. Se ha estudiado gran variedad de estas moléculas entre las que se encuentran los antígenos SLe^X, CEA, CA-125, CA19-9, CA 15.3, SLe^A, Le^Y, Le^X-Le^X, Tn y sTn, entre otros (Pinho et al., 2015). Muy pocas son de utilidad en el diagnóstico temprano de cáncer, pero la gran mayoría ayudan en la etapa de evaluación del tratamiento.

Diversos estudios se han orientado hacia la búsqueda del marcador tumoral que permita detectar oportunamente el cáncer para así poder evaluar integralmente las diferentes alternativas terapéuticas. Un interés especial se ha dado a los antígenos T, su precursor Tn y sus formas sialiladas (Springer, 1984; Lisowska, 1995; Kishikawa et al., 1999; Julien et al., 2012; Ju et al., 2011 y 2013; Munkley, 2016), así como al mecanismo de las lectinas vegetales para reconocerlos (Rouge et al., 2011). Los antígenos T, Tn y sTn están asociados a una gran cantidad de carcinomas y permiten la predicción de algunos tumores durante su curso clínico. El interés en estos antígenos y las moléculas que los detectan ha ido incrementándose y es por esto que el Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP) inició hace algunos años un estudio detallado sobre las lectinas de Lamiáceas de Colombia (Vega, 1997; Fernández-Alonso et al., 2003; Pérez et al., 2006; Fernández-Alonso et al., 2009). El conocimiento de estas especies es muy escaso, particularmente en lo que

respecta a las lectinas que poseen y que han sido detectadas en algunas especies de la zona templada, las cuales son capaces de reconocer el antígeno Tn. Como trabajo del grupo se caracterizó molecularmente LSBo-I y se hicieron estudios para la detección de la presencia del antígeno Tn en líneas celulares preestablecidas, cultivos primarios y en células escamadas de orina de pacientes con cáncer de vejiga en diferentes estadios de la enfermedad (Vega, 2004; Vega y Pérez, 2006).

Algunos estudios con lectinas de Leguminosas han permitido establecer cómo es la estructura del sitio de combinación con carbohidratos y explican a nivel molecular cómo son las interacciones proteína-proteína, proteína-célula, célula-célula mediadas por este tipo de moléculas (Sharon y Lis, 2001). A pesar de la importancia que tienen las lectinas de Lamiaceae por el reconocimiento del antígeno Tn, existe información estructural muy escasa para avanzar en el conocimiento de estas moléculas, entender su mecanismo de interacción con los carbohidratos (Rougé et al., 2011), comprender cómo las lectinas podrían ser de utilidad para el diagnóstico y pronóstico de patologías, así como la forma en que pueden interactuar con otras glicoproteínas ricas en el antígeno como son las mucinas epiteliales. El aislamiento en una cantidad suficiente para su caracterización molecular y estructural presenta varias dificultades, por lo tanto muy pocas lectinas de especies endémicas han sido purificadas y caracterizadas bioquímicamente (Lis y Sharon, 1994; Sanabria, 1999; Medeiros et al., 2000; Vega y Pérez, 2006; Pérez y Vega, 2007); sin embargo, las lectinas de *Glechoma hederacea* (Wang et al., 2003a) y *Salvia miltiorrhiza* (Wenping et al., 2015) fueron obtenidas mediante clonación molecular para realizar los estudios relacionados con su estructura.

El establecimiento de la estructura terciaria para explicar la especificidad de las lectinas, forma de interacción con el carbohidrato y sus posibles aplicaciones biológicas, requiere conocer los diferentes niveles estructurales de estas proteínas, por lo tanto este trabajo estuvo encaminado a hacer un aporte al conocimiento de las características estructurales de las lectinas de *Lepechinia bullata* y de *Salvia bogotensis*, que permitan posteriormente elucidar su estructura tridimensional y estudiar su interacción con el antígeno Tn. De esta forma se profundizará en el conocimiento de nuevas proteínas con un gran potencial biotecnológico derivadas de especies vegetales endémicas de Colombia.

La propuesta de investigación desarrollada se basó en la siguiente hipótesis: “Las lectinas aisladas de las semillas de *Lepechinia bullata* y de *Salvia bogotensis*, caracterizadas bioquímicamente y con un análisis preliminar de la estructura primaria tendrán una secuencia de aminoácidos similar a la de lectinas de Leguminosas y/o animales, y por lo tanto serán de utilidad en las ciencias biomédicas”.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la estructura primaria parcial de una de las lectinas de Lamiácea específica para el antígeno Tn y detectar nuevas lectinas en semillas de *Salvia bogotensis* y/o *Lepechinia bullata*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar bioquímicamente la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) y compararla con otras lectinas específicas para el antígeno Tn.
- Determinar la secuencia parcial de aminoácidos de la(s) lectina(s) presente(s) en semillas de *Lepechinia bullata* y/o *Salvia bogotensis*, específicas para el antígeno Tn.
- Realizar estudios preliminares para la obtención de una proteína recombinante de *Lepechinia bullata*.
- Detectar la presencia de nuevas lectinas en las semillas de *Salvia bogotensis* y/o *Lepechinia bullata*.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades sobre lectinas

La primera definición de lectina fue realizada por Shapleigh y Boyd, quienes introdujeron este término por derivarse de la palabra latina *Legere*, que significa seleccionar o escoger. (Boyd y Shapleigh, 1954).

Las lectinas son un grupo de proteínas con especificidad en el reconocimiento de carbohidratos. Son diferentes a los anticuerpos, a proteínas transportadoras de mono y oligosacáridos libres, y a las enzimas encargadas de la biosíntesis de oligosacáridos (Rüdiger y Gabius, 2009).

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas a partir de plantas, virus, bacterias y animales invertebrados y vertebrados incluyendo mamíferos. Así mismo, han sido reportadas lectinas núcleo-citoplasmáticas y lectinas destinadas para secreción. Algunas de estas proteínas pueden expresarse induciblemente (como respuesta a condiciones ambientales), mientras que otras aparecen constitutivamente (Van Damme et al., 2008). La gran especificidad de lectinas hacia determinadas moléculas de carbohidratos, las ha convertido en una herramienta importante en la investigación biomédica, principalmente en el diagnóstico de diversas enfermedades relacionadas con la alteración de perfiles de glicosilación de células (Ghazarian et al., 2011; André et al., 2015; Kudelka et al., 2015), así como en la identificación y bloqueo de agentes virales y microbiológicos (Akkouh et al., 2015). Adicionalmente, las lectinas han sido reconocidas como elementos valiosos para investigación y diagnóstico en cáncer (Mislovicová et al., 2009; Ghazarian et al., 2011; André et al., 2015; Kudelka et al., 2015; Syed et al., 2016).

Algunos métodos para estudiar la interacción entre lectinas y carbohidratos incluyen la aglutinación de eritrocitos y de otros tipos celulares. Así mismo, las lectinas han sido una herramienta importante en los estudios de purificación y caracterización estructural de los

oligosacáridos presentes en glicoconjugados (Yamamoto et al., 2004; Bedair y El Rassi, 2005; André et al., 2015; Bojarová y Kren, 2016).

Con lectinas se han desarrollado técnicas cromatográficas y de microarrays, posibilitando el estudio de gran variedad de carbohidratos y glicanos complejos con la ventaja de ser pruebas altamente sensibles que permiten realizar múltiples análisis simultáneos usando cantidades pequeñas de lectina purificada (Nilsson, 2007; Van Damme et al., 2011; Wu et al., 2014; Hirabayashi, 2015). Sin embargo, para emplear estas proteínas es importante delinear su especificidad, es decir, cuál es la estructura glicosídica exacta que ellas reconocen, incluyendo el tipo de enlace glicosídico (α y/o β), la clase de unión (1-3, 1-4, 1-6) y el tipo de estructura (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos), entre otros. El estudio detallado de la especificidad de las lectinas es posible empleando la técnica Cromatografía Frontal de Afinidad (FAC), que ha permitido distinguir entre estructuras muy similares de oligosacáridos, lo cual no es posible por otras técnicas analíticas (Hirabayashi y Kasai, 2002; Nakamura-Tsuruta et al., 2007; Kasai, 2014). Las lectinas cuya especificidad ha sido bien definida han sido la base para el desarrollo de microarreglos (lectin-arrays) que permiten el análisis estructural de un gran número de oligosacáridos que están presentes en células normales y tumorales y que tienen relevancia biológica (Kuno et al., 2010; Vasta y Ahmed, 2009; Matsuda et al., 2008; Tateno et al., 2008; Tateno et al., 2009); sin embargo, además de emplear lectinas comerciales, es necesario incrementar la disponibilidad de lectinas no comerciales, con especificidades diferentes de las ya establecidas.

Actualmente, se están desarrollando técnicas que utilizan en conjunto microarrays (hechos a base de para lectinas naturales, lectinas recombinantes remodeladas, glicanos sintéticos y recombinantes, glicanos naturales y sintéticos), modelamiento bioinformático y espectrometría de masas (EM), entre otras, para estudios de ensayos de bioreconocimiento y aplicaciones con fines de diagnóstico clínico, por lo que el uso de lectinas en el campo de la glicómica se ha convertido en un área prometedora de la glicobiología, en la que aún falta mucho por explorar (Mislovicová et al., 2009; André et al., 2015; Bojarová y Kren, 2016).

El Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP) actualmente es uno de los pocos laboratorios en América Latina dedicados al campo de las lectinas provenientes de Leguminosas, Lamiáceas y más recientemente de algas marinas (Pérez, 1993; Almanza et al., 2004; Melgarejo et al., 2005; Vega y Pérez, 2006; Pérez y Vega, 2007; Cortázar et al., 2016; Wilches et al., 2016; Carreño et al., 2016; Casas et al., 2016a; Casas et al., 2016b).

3.2 Lectinas animales

Las estructuras primarias de las 18 diferentes familias en las que se clasifican las lectinas animales según su plegamiento y características (Gabius y Gabius, 1997; Vasta y Ahmed, 2009), se encuentran reportadas en el Protein Data Bank (RCSB-PDB) y en UniprotKB/Swiss-Prot. Adicionalmente ha sido establecida la estructura terciaria de más de 250 proteínas, dando origen a 18 familias con por lo menos un representante (Loris, 2002), siendo de origen muy variado como la de almeja (Gourdine et al., 2007), Proteína de Unión a Manosa (MBP) (Weiss et al., 1991), Selectina E (Graves et al., 1994), lectinas de tipo C en veneno de serpiente (Hamako et al., 2007; Sartim y Sampaio, 2015) y Galectinas, siendo estas últimas un amplio grupo de lectinas animales expresadas en varios tipos celulares, que cumplen funciones a nivel intracelular pero también lo hacen siendo secretadas para unirse a glicoconjugados en la superficie celular (Liao et al., 1994; Thiemann y Baum; 2016). En el caso de las Galectinas, la -1 y -3 fueron aisladas en a partir de tejidos de mamíferos; las lectinas -1, -4, -6 y -9 se expresan en células del tejido epitelial, endotelial y del sistema inmune; y las Galectinas -5, -10, y -14 se han detectado en distintas poblaciones celulares (Rapoport et al., 2008).

En general, las lectinas de origen animal han sido relacionadas con varios procesos fisiológicos y patológicos incluyendo funciones de chaperonas, direccionamiento intracelular de glicoconjugados, transporte intracelular, mediación de endocitosis, reconocimiento de glicanos foráneos, inducción o supresión de moléculas efectoras, regulación del crecimiento celular, inducción de apoptosis e interacciones célula – célula, mediación de la respuesta inmune e inflamatoria, progresión y desarrollo tumoral, degeneración neural, arteriosclerosis y aterosclerosis, diabetes, entre otras (Ambrosi et al., 2005; Yang et al., 2008; Thiemann y Baum; 2016).

3.3 Lectinas vegetales

El estudio de las lectinas inició en el año 1888 gracias a los hallazgos acerca de la relación existente entre la toxicidad de los extractos de semillas de castor y la presencia de un factor proteico hemoaglutinante denominado “ricina” (Stillmark, 1888). En los años siguientes se reportaron toxinas similares en otras plantas. En 1898 se introdujo el término hemaglutinina para definir todas las proteínas de plantas que presentaran características de aglutinar células sanguíneas (Elfstrand, 1898). El primer reporte de hemaglutininas no tóxicas fue realizado en 1907, describiendo la presencia de lectinas en Leguminosas (Landsteiner y Raubiteschek, 1907), de ahí en adelante se descubrieron diversas lectinas no tóxicas. Hacia 1940 se reportó que algunas semillas presentaban aglutininas específicas para los antígenos de los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO; debido a esta propiedad selectiva se acuñó el término lectina (Boyd y Reguera, 1949).

Las lectinas son proteínas ubicuas encontradas principalmente en semillas (Cavada 1998), aunque también están presentes en menor cantidad en hojas, cáscaras, frutos, raíces y flores (Martínez y Córdoba, 2000; Mishra 2004; Naeem 2001). En la célula, las lectinas pueden ser almacenadas en las vacuolas de los cotiledones y endospermos de las semillas, en cantidades que oscilan entre el 2% y el 10% de proteína total; éstas son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla junto con otras proteínas de almacenamiento (Melgarejo et al., 1997 ; Martínez, 2009). En algunas células las lectinas pueden ser encontradas en citoplasma y espacio intracelular (Nascimento et al., 2012).

En *Canavalia ensiformis* se reportó la interacción de la lectina Con A con Vicilina (una proteína de almacenamiento) lo que permitió relacionarla con el mecanismo de deposición de las vicilinas y sugerirlo como un proceso generalizado en las semillas de Leguminosas mediando la deposición de las proteínas de almacenamiento en el cuerpo proteico, lo que podría explicar el por qué las lectinas y las proteínas de reserva se encuentran en el mismo organelo subcelular dentro de las semillas (Martinez, 2009).

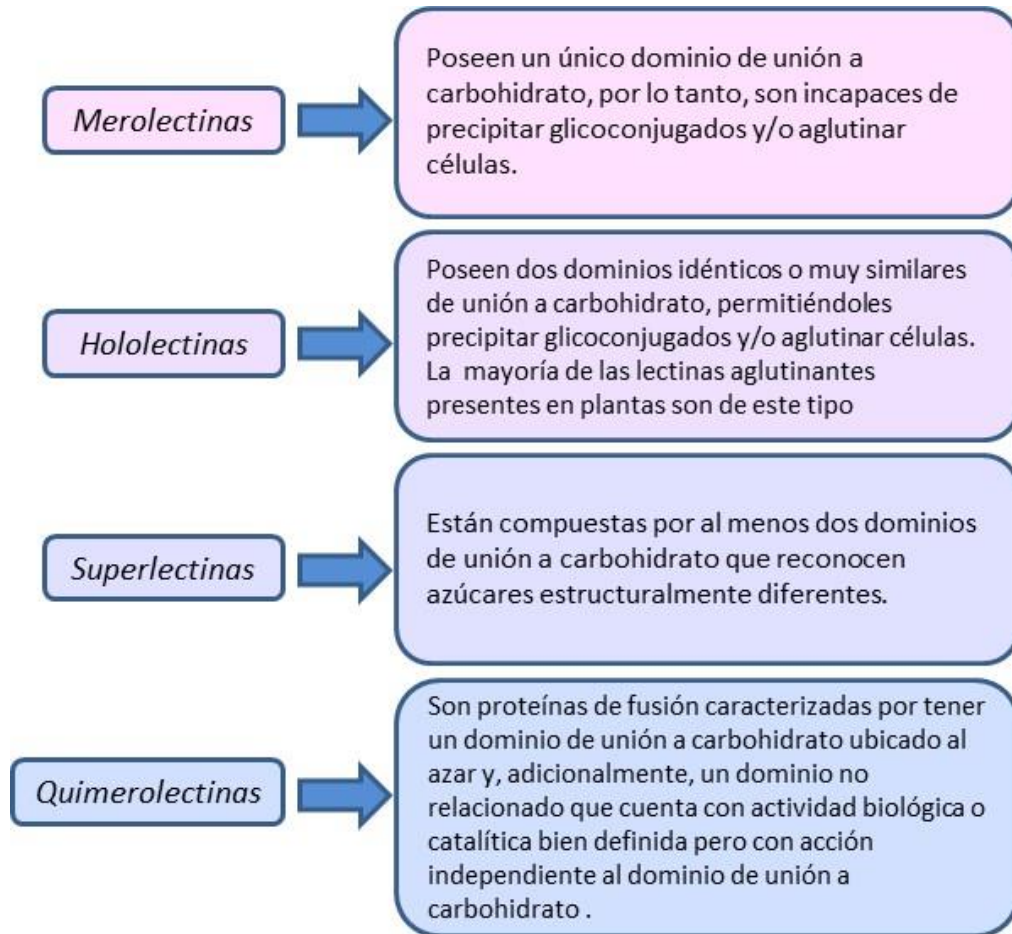
La presencia de lectinas ha sido relacionada con mecanismos de defensa contra insectos (De Schutter y Van Damme, 2015; Dang y Van Damme, 2015, Macedo et al., 2015; Raja et al., 2016; Lima et al., 2016), almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos,

procesos de regulación fisiológica y de estimulación mitogénica (Gabiús et al., 2002; Maciel et al., 2004, Dan y Ng, 2016; Casas et al., 2016) y reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* (Pusztai, 1991; Gabiús et al., 2002), en las que también se observó que lectinas vegetales presentes en el suelo incrementan la formación de biopelículas en estas bacterias (Pérez-Giménez et al., 2009); gracias a esta propiedad, son también usadas como una alternativa biotecnológica en el control de biopelículas bacterianas con fines de aplicación clínica (Cavalcante, 2014).

Las lectinas vegetales han sido utilizadas ampliamente en el estudio de estructuras de superficies celulares, en el reconocimiento de grupos sanguíneos, y como agentes mitogénicos, en el aislamiento de glicoconjugados que presenten estructuras glicosídicas capaces de unirse a ellas, en la identificación de sitios específicos de unión a carbohidratos en proteínas y en el reconocimiento de estructuras cancerosas (Lis y Sharon, 1986; Green, 1989; Barre et al, 2001; Satomaa et al., 2009; Dass, 2015; Kudelka, 2015; Syed et al., 2016; Gorakshakar y Ghosh, 2016).

Para el estudio de las lectinas, actualmente algunos investigadores prefieren hacer el aislamiento y la caracterización estructural por medio de proteínas recombinantes. La ventaja radica en que este proceso representa menor dificultad en la obtención de moléculas puras y en cantidad suficiente para llevar a cabo estos ensayos (Susuki, 1996; Tateno et al., 2003; Kong et al., 2004, Tanaka et al., 2009; Varejão et al., 2010; Fuqua et al., 2015; Lopes-Sousa et al, 2016).

Pasando a la clasificación de estas moléculas, en el siguiente esquema se define cada una de las clases de lectinas tomando como base el sitio de reconocimiento a carbohidrato (Van Damme et al., 1998; Jiang et al. 2010).

Figura 3-1: Clasificación de las lectinas según el sitio de reconocimiento a carbohidrato.

Unido a lo anterior, las lectinas vegetales también pueden clasificarse dependiendo de la especificidad hacia el monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante (Hernández et al. 2005), según el carbohidrato que reconocen (manosa, manosa/glucosa, N-acetilglucosamina/glucosa, N-acetilgalactosamina/galactosa, fucosa, entre otros) (Azevedo-Moreira et al. 1991, Hernández et al. 2005), y según su estructura (Azevedo-Moreira et al. 1991; Wright, 1997; Peumans y Van Damme, 1998; Hernández et al. 2005; Van Damme, 2008; Jiang et al. 2010; Santos et al., 2014). Sin embargo, en la siguiente figura (3.2), se resumen los hallazgos alrededor de estudios de lectinas presentes en plantas, clasificándolas molecularmente en doce familias (Wright, 1997; Peumans y Van Damme, 1998; Hernández et al. 2005; Van Damme, 2008; Jiang et al. 2010; Santos et al., 2014).

Figura 3-2: Clasificación según familias de lectinas.



3.3.1 Lectinas de la familia Leguminosae

En 1957 fueron reportados diversos extractos de semillas de Leguminosas con actividad hemoaglutinante, algunos de los cuales mostraban especificidad por grupos sanguíneos (Mákela, 1957).

Estas proteínas generalmente se encuentran constituidas por dos o cuatro subunidades idénticas con un peso molecular entre 25 y 30 kDa, cada una de las cuales contiene un sitio de unión para iones metálicos Ca^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} . Un ejemplo típico de lectinas diméricas son las pertenecientes a la tribu *Viceae*; por su parte las tetraméricas lo constituyen las lectinas presentes en especies de la tribu *Diocleae*, específicas por glucosa/manosa.

En la figura 3-3 se muestra un ejemplo de este tipo de estructuras que corresponde a Concanavalina A (Con A) (PDB 3CNA), evidenciando la estructura clásica de lectinas de la familia Leguminosae. Esta lectina es extraída de *Canavalia ensiformis*, y fue una de las primeras en ser caracterizada y conocida su estructura tridimensional. Reconoce específicamente α -D-glucosa y α -D-manosa, así como oligosacáridos ricos en manosa, enlazándose a glicoproteínas y glicolípidos (Hardman y Ainsworth, 1972).

Figura 3-3: Estructura tridimensional de Concanavalina A.

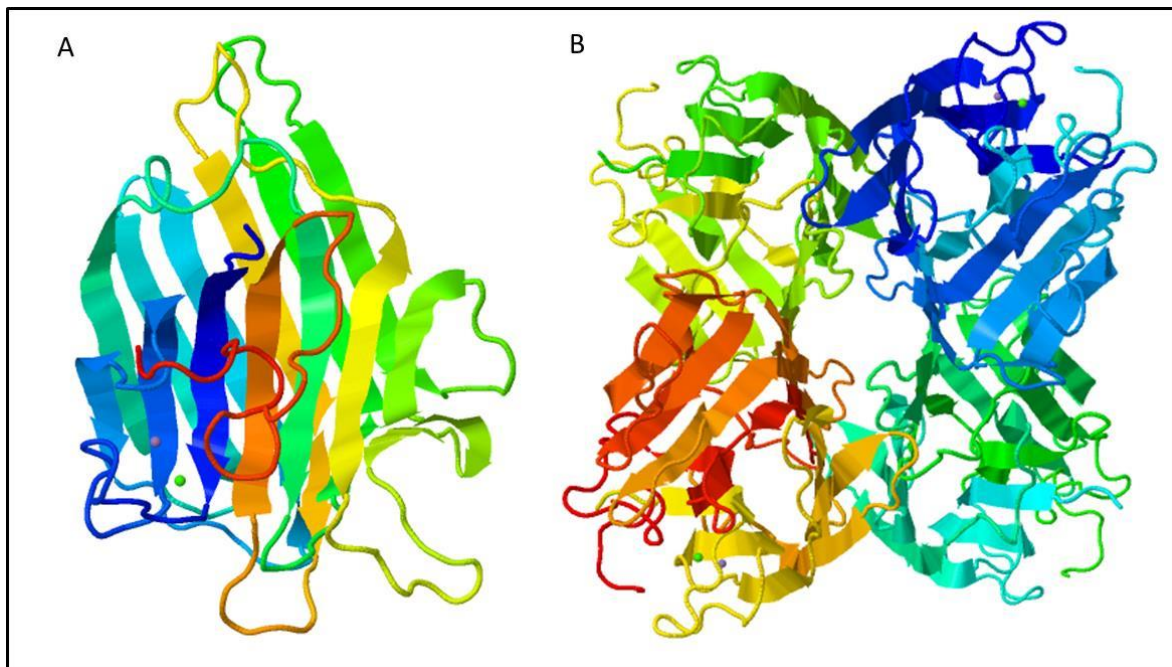


Figura tomada del Protein Data Bank (PDB 3CNA). Resolución 2.4 angstroms. Cada hebra, bucle y subunidad están representados en un color diferente. Las esferas verde y gris simbolizan los iones calcio y manganeso necesarios para la actividad de Con A. **A.** Estructura monomérica simbolizada desde el extremo amino terminal en azul oscuro, hasta el carboxilo terminal representado en rojo. **B.** Interacción de las cuatro subunidades idénticas para formar el tetrámero de Concanavalina A.

En la estructura de lectinas tipo Leguminosa las cadenas se encuentran asociadas de forma no covalente. Se ha encontrado gran homología estructural entre todas las subunidades presentes en la molécula, el plegamiento típico de los monómeros es de tipo "Jelly roll" constituyéndose de tres hojas: una trasera con 6 hebras antiparalelas de forma plana, una delantera cóncava, con siete hebras y una más pequeña con cinco hebras que mantiene juntas las otras dos hojas, lo que genera una estructura aplanada en forma de domo con cuatro bucles localizados en la parte superior del monómero formando el sitio de reconocimiento a carbohidratos. Este plegamiento típico se denomina el "*legume lectin fold*" que también ha sido hallado en algunas proteínas bacterianas, fúngicas y animales (Sharon y Lis, 2001).

En la familia Leguminosae se han descrito varias lectinas con especificidad por el antígeno Tn. Éste es el caso de la lectina presente en *Vatairea macrocarpa* (Lopes-Sousa et al., 2015) *Abrus precatorius*, *Arachis hypogaea*, *Griffonia simplicifolia*, *Psophocarpus tetragonolobus*, *Vicia gramínea* y *Vicia villosa isolectina B₄* (Rougé et al., 2011). De esta última, un análisis de su estructura tridimensional mostró que la unión al antígeno Tn está mediada por una red de puentes de hidrógeno entre O3, O4, O6 y el grupo N-acetil del GalNAc, con los aminoácidos Asp85, Gly103, Asn129 y Asn214, presentes en el bolsillo de unión a carbohidrato de la lectina. El residuo Tyr127 también está involucrado en la interacción con el anillo de la piranosa del GalNAc, y por un puente de hidrógeno adicional formado con el OH de la serina del antígeno Tn; considerando este último residuo como responsable de la especificidad de la lectina por el determinante Tn (Babino et al., 2003).

Varias de las lectinas que se han descrito con afinidad por el antígeno Tn tienen una estructura y un mecanismo de reconocimiento al carbohidrato muy similar (Rougé et al., 2011).

Las lectinas de Leguminosas en general tienen una amplia especificidad por diversos residuos de carbohidratos a pesar de tener secuencias de aminoácidos muy conservadas entre las diferentes especies. Estas proteínas han sido durante décadas un paradigma en el campo de interacciones proteína-carbohidrato y su relación estructura-función (Loris et al., 1998, Goldstein y Poretz, 2012). Las numerosas secuencias disponibles (RCSB_PDB, UniprotKB/Swiss-prot) muestran un alto grado de similitud en estructura primaria, con alrededor de 20% de aminoácidos idénticos y un 20% de similaridad. Los aminoácidos

conservados incluyen aquellos que conforman el “*sitio de unión*” del carbohidrato y los que coordinan los iones metálicos (Van Damme et al. 1998). La similitud en la estructura primaria y las diferencias de especificidad respecto a un carbohidrato dado, hacen de estas proteínas un modelo apropiado para el estudio a nivel molecular de las relaciones estructura - función.

Recientemente, la lectina encontrada en *Vatairea macrocarpa* fue propuesta como una molécula de utilidad para la detección de células cancerosas debido al reconocimiento que tiene sobre el antígeno Tn (Lopes-Sousa et al., 2016). La proteína es tetramérica y cada subunidad tiene 240 residuos de aminoácidos. Su estructura terciaria corresponde a lectinas tipo Leguminosa, en donde se observa reconocimiento por GalNAc y por el antígeno Tn, y contiene el motivo “*jelly roll*” construido por una lámina de seis y otra de siete hebras, interconectadas por diversos loops de longitud variable. En la figura 3-4 se muestra el modelo tridimensional de reconocimiento de la lectina por el antígeno Tn (Lopes-Sousa et al., 2016).

En la estructura se observa que el anillo piranosa del azúcar está ubicado entre la cadena alifática de la Leu215 y el anillo aromático de Phe129. Por otra parte, el grupo 4-OH del azúcar establece un puente de hidrógeno con el grupo hidroxilo del Asp109 y con el grupo amino de Leu215. El grupo 3-OH del GalNAc en el antígeno Tn interactúa con Asp109 y Asn131. También se encontraron puentes de hidrógeno entre el hidroxilo del carbono 6 del azúcar y el hidroxilo de la cadena sustituyente de Ser216, así como la interacción del grupo carbonilo del N-acetil con el amino de Gly107.

La estructura también evidenció la formación de un bolsillo hidrofóbico en el cual se acomoda el grupo N-acetil del carbono 2 en el GalNAc, éste está formado por Phe108 y Trp132. Estas interacciones son comunes en el reconocimiento de GalNAc y del antígeno Tn, sin embargo para este último se encontraron adicionalmente tres moléculas de agua que ayudan a estabilizar el complejo Lectina-Antígeno Tn mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno (Lopes-Sousa et al., 2016).

Figura 3-4: Modelo de reconocimiento de GalNAc por la lectina de *Vatairea macrocarpa*.

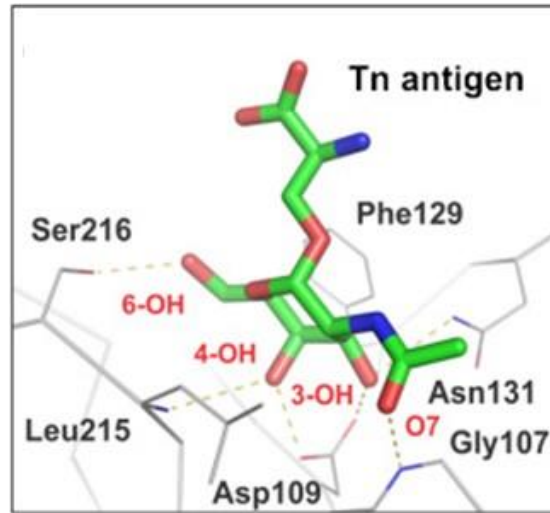


Figura tomada de Lopes-Sousa et al., 2016. La representación del sitio de unión del carbohidrato en la lectina de *Vatairea macrocarpa* muestra las interacciones por puentes de hidrógeno (líneas punteadas amarillas) con el antígeno Tn (estructura en barras verde, azul y roja). Los residuos de aminoácido involucrados en el reconocimiento se muestran en líneas continuas.

Por otra parte, en la tribu *Diocleae* varias lectinas han sido purificadas y caracterizadas con algunas diferencias bioquímicas y similitudes moleculares. Hasta hace muy poco, dentro de la familia Leguminosae, la subtribu denominada *Diocleinae* estaba clasificada como una de las subdivisiones de la tribu *Phaseoleae*. Un exhaustivo análisis filogenético molecular basado en marcadores nucleares y de cloroplasto, reconsideró la clasificación de esta subtribu *Diocleinae* a nivel de tribu *Diocleae*, con tres linajes principales: *Canavalia*, *Dioclea* y *Galactia*. El linaje *Canavalia* contiene a las especies del género *Canavalia*; el linaje *Dioclea* a los géneros *Dioclea*, *Cymbosema*, *Cleobulia* y *Macropsyчанthus*; y el linaje *Galactia* a los generos *Galactia*, *Neorudolphia*, *Rhodopsis*, *Bionia*, *Cratylia*, *Lackeya*, *Camptosema* y *Collaea* (de Queiroz et al., 2015).

Lectinas de varias especies de la tribu *Diocleae* han sido aisladas y descritas en términos de sus características fisicoquímicas y de sus especificidades (Ramos et al., 1996, Dam et al., 1998a, 1998b, 2000), así como de la termodinámica de unión a carbohidratos (Dam et al., 2000). Un aspecto interesante de esta tribu, es el hecho de que en sus semillas se han encontrado dos lectinas con propiedades fisicoquímicas diferentes. El grupo de investigación en Proteínas (GRIP) ha detectado, aislado y descrito dos lectinas diferentes (I y II) en semillas de *Dioclea lehmanni* (LDL), *Dioclea sericea* (LDS), *Dioclea grandiflora*

(LDG), *Canavalia ensiformis* (LCE) y *Galactia lindenii* (LGL) con características fisicoquímicas y diferente especificidad (Pérez G., 1998; Sierra y Pérez, 1999; Melgarejo et al., 2005; Quintero, 2014; Casas et al., 2016; Carreño et al., 2016). Una actividad biológica importante de varias de estas lectinas es su capacidad mitogénica sobre linfocitos en sangre periférica. Por ejemplo, la lectina de *Cratylia mollis* presenta reconocimiento sobre manosa/glucosa y es estructuralmente similar a la lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA); ambas tienen utilidad en estudios citogenéticos (Tavares et al., 1996; Maciel et al., 2004).

3.3.2 Lectinas de la familia Lamiaceae

En contraste con la gran cantidad de información disponible acerca de lectinas animales y de Leguminosas respecto a su distribución, aislamiento, caracterización y determinación de parámetros estructurales en los diferentes niveles de organización, la información sobre lectinas de Lamiaceae es muy escasa a pesar del interés que suscitan por su especificidad de reconocimiento hacia el antígeno Tn presente en células tumorales (Munkley, 2016; Wu et al., 1997). Ésta es una de las líneas de investigación del Grupo de Investigación y el trabajo realizado permitió publicar en el 2007, una revisión de las lectinas de los diferentes géneros de Lamiáceas estudiados hasta el momento y el estado del tema sobre la caracterización bioquímica de las cinco proteínas aisladas y estudiadas (Pérez y Vega, 2007).

La familia Lamiaceae, se conoce comúnmente como Lamiáceas o Labiadas debido a la presencia de labios en sus flores. Está compuesta aproximadamente de 252 géneros y 6700 especies en todo el mundo, entre las que se encuentran *Glechoma*, *Hyptis*, *Mentha*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Salvia* y *Lepechinia*, entre otras (The plant list, 2013; Olmstead, 2016). En Colombia, está representada por 41 géneros y 308 especies. El género *Salvia* es el más diverso de la familia Lamiaceae, contando con al menos 88 taxones de hierbas y arbustos (Fernández-Alonso, 2012); por su parte, del género *Lepechinia* se han reportado 10 especies en el territorio colombiano (Fernández-Alonso, 2009).

La habilidad que poseen las lectinas de algunas especies de Lamiáceas para reconocer el antígeno Tn (GalNAc α -Ser/Thr) reviste gran importancia ya que normalmente se

encuentra enmascarado en la superficie celular y es indetectable. En el caso del síndrome de poliaglutinabilidad de eritrocitos, el desorden se caracteriza por la exposición en la superficie de la célula del antígeno Tn presente en sialoglicoproteínas modificadas (Berger, 1999). Cartron et al. (1978) presentaron evidencia con respecto a que las células portadoras del antígeno Tn carecen de la enzima 3 β -D-galactosiltransferasa, sugiriendo que son el resultado de una mutación somática en la cual la adición de galactosa para formar el antígeno T no tiene lugar. El síndrome Tn está asociado con anemia hemolítica suave y leucopenia; también ha sido descrito en algunas anemias agudas o desórdenes mieloproliferativos (Roxby et al., 1992).

El antígeno Tn, su precursor T y su forma sialilada (sialil-Tn) están asociados con una gran variedad de carcinomas y los eventos metabólicos que llevan a su exposición parecen ser diferentes de lo ocurrido con el síndrome Tn, los niveles de la enzima β -galactosiltransferasa encontrados en tejidos cancerosos y normales son similares (Dahiya et al., 1992; Cazet et al., 2010; Ju et al., 2011; Wang et al., 2013, Munkley 2016), por lo tanto la biosíntesis de los oligosacáridos presentes en células normales es diferente a la de células transformadas.

En el curso de sus trabajos sobre tipificación de grupos sanguíneos, Bird y Wingham detectaron la presencia de aglutininas (lectinas) en extractos salinos de semillas de 5 especies de *Salvia* de las 8 ensayadas (*S. sclarea*, *S. sclarea turkestanica*, *S. haematodes*, *S. farinacea* y *S. horminum*) que reconocían los factores Tn y Cad, donde el inmunodeterminante es la N-acetilgalactosamina (Bird y Wingham, 1974).

En 1976 los mismos autores reportaron la presencia de aglutininas del tipo T y Tn en 6 *Salvias* más (de un total de 13 estudiadas), (*S. aethiopsis*, *S. nemorosa*, *S. sclareoides*, *S. taraxacifolia* y *S. verbenacea*) que contienen cantidades variables de la proteína (Bird y Wingham, 1976). Posteriormente fue descrita la reacción Tn-aglutinante de 9 especies de *Salvia* (*S. aurea*, *S. candelabrum*, *S. forskohlei*, *S. grandiflora*, *S. japonica*, *S. nilotica*, *S. superba*, *S. transylvanica* y *S. verticillata*) (Bird y Wingham, 1977). Más adelante, en 1982 se reportó la presencia de lectina Tn en *Salvia lyrata* (Bird y Wingham, 1981), sin embargo no se intentó la purificación de ninguna de ellas.

Todas estas especies pertenecen a los subgéneros *Salvia* Benth y *Sclarea* Benth que predominan en Eurasia y en zonas templadas de Norteamérica; por el contrario, las especies pertenecientes al subgénero tropical *Calosphace* (Benth) (más de 450) permanecen prácticamente inexploradas en este aspecto. En otros géneros de Lamiáceas también se han encontrado lectinas de semillas que reaccionan específicamente con el antígeno Tn (*Hyptis* sp. y *Marrubium velutinum*) (Bird y Wingham, 1981; Bird y Wingham, 1982).

Por otra parte, las lectinas que presentan dominio tipo Leguminosa han mostrado actividad insecticida e insectistática (Casas et al., 2016). Se ha identificado que la estructura tridimensional de la lectina de *Glechoma hederácea* (Gleheda) presenta un dominio tipo Leguminosa, y se ha reportado su actividad insectistática sobre las larvas del escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*) (Wang, 2003b), encontrando que las larvas que ingieren el alimento impregnado en una solución de Gleheda no llegan al estado de pupa, lo que evidencia una afectación en el desarrollo del insecto (Wang, 2003b).

El estudio de las Lamiáceas ha crecido sustancialmente desde los años 70, enfocándose principalmente en el análisis de metabolitos secundarios, mucílago, cariotipo y morfología comparativa de miembros de la familia Lamiaceae originarios de Eurasia y Norte América (Ibrahim y Aquel, 2010; Bezić et al., 2013); así mismo se han reportado estudios relacionados con plantas de la misma familia, originarias de Sur África (Kamatou et al., 2008), América Central y Sur América.

Son limitados los estudios publicados que describen las lectinas de Lamiáceas. En 1986, Piller et al. aislaron y caracterizaron parcialmente la lectina encontrada en *Salvia sclarea* (LSS), describiéndola como una glicoproteína (Mr. 50 kDa) formada por dos subunidades (cada una de Mr. 35 kDa) unidas mediante enlaces disulfuro. Tiene constantes de asociación de $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para eritrocitos Tn y de $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para el determinante sanguíneo Cad (GalNAc β 1-4Neu5Ac α 2-3Gal β - R); adicionalmente, no parece requerir cationes divalentes para ser activa. En el año 2000, Medeiros et al. publicaron una caracterización más detallada de la lectina, refiriéndola como una glicoproteína homodimérica (Mr. 60-61 kDa) con subunidades (Mr. 30-31 kDa) unidas por un puente disulfuro; otros autores establecieron la estructura del oligosacárido. El estudio de la

interacción de la lectina con glicopéptidos sintéticos Tn mostró que reconoce un sólo determinante Tn con respecto a los anticuerpos monoclonales (anti-Tn); en este último caso requieren una mayor densidad de determinantes sintéticos (Osinaga et al., 2000).

En 1990 se publicó un estudio relacionado con la interacción de esta lectina con líneas celulares tumorales y con su capacidad de reconocimiento del antígeno Tn en células provenientes de tumores (Piller et al., 1990a). Posteriormente, se describió la especificidad de LSS y se comparó con seis lectinas que reconocen residuos de GalNAc, concluyendo que LSS era la más específica hacia residuos de GalNAc-O-(Ser/Thr) (antígeno Tn) (Piller et al., 1990b; Wu et al., 1997; Medeiros et al., 2000), y que su afinidad aumenta al unirse a unidades estructurales con una alta densidad del antígeno Tn (Wu, 2005). Con esta lectina Piller et al. (1990a) realizaron estudios sobre la iniciación de la síntesis de proteínas O-glicosiladas en la línea celular K562 (Leucemia) y aislaron proteínas altamente glicosiladas ricas en estructuras Tn. Esta lectina ha sido utilizada como herramienta para la caracterización de glicoforinas (Lee et al., 1981; Wu et al., 1995) y para evidenciar aglutinación de eritrocitos de personas que presentan el síndrome Tn (Kamitani et al., 1992).

Posteriormente, el grupo de Sharon adelantó una serie de estudios con otra lectina de la familia de las Lamiáceas aislada de semillas de *Moluccella laevis* (Lis y Sharon, 1994). Esta lectina se caracteriza por tener unos rasgos estructurales muy particulares que no se han encontrado en otras lectinas vegetales. La proteína nativa tiene un peso molecular de 130 kDa y está formada por tres subunidades, una de 67 kDa (compuesta por dos cadenas de 46 y 28 kDa unidas por puentes disulfuro) y dos subunidades de 42 y 26 kDa. Es muy estable bajo condiciones de disociación y retiene su actividad aún después de exposición a úrea 8 M, permitiéndole unir carbohidratos en presencia de agentes denaturantes. Esta propiedad fue útil al purificar la especie de 42 kDa (que carece de actividad biológica) y la subunidad de 26 kDa donde se observó la actividad aglutinante hacia eritrocitos A (50-10 ug/ml) y N (25-12 ug/ml). La especificidad hacia el antígeno Tn fue determinada por ensayo de ELLSA (Enzyme Linked Lectino-Sorbent Assay) con varias glicoproteínas. Finalmente se determinó una actividad de aglutinación dual de tipo A+ Tn (Duk et al., 1992).

La lectina de las hojas de *Glechoma hederacea* (Gleheda) fue aislada en el año 2003 por Wang (2003b), y descrita como una potente hemaglutinina que presenta estructura

tetramérica de 130 kDa con subunidades de 28 kDa enlazadas por puentes disulfuro intercatenarios. En condiciones reductoras, su patrón electroforético muestra dos bandas de 28 kDa y 26 kDa que representan el 66% y 34% respectivamente del total de la proteína; estas dos especies cuentan con la misma secuencia en el extremo N-terminal, lo que permitió proponerlas como glicofomas de la lectina pero con diferente grado de glicosilación; ésta reconoce residuos de GalNAc y posee mejor actividad aglutinante sobre los eritrocitos tripsinizados de conejo que sobre los eritrocitos del grupo A.

Para corroborar la especificidad de Gleheda hacia carbohidratos se utilizó la técnica de Resonancia en Superficie del Plasmón, encontrando interacción con asialomucina y asialofetuína, proteínas que contienen O-glicanos y que exponen residuos terminales de Gal y GalNAc. También se encontró que Gleheda interactúa con mucina nativa, pero no lo hace con la fetuína sialilada (Wang et al., 2003a). Con la lectina recombinante obtenida por clonación molecular y el análisis por BLAST de su secuencia amino terminal, se determinó la similitud con el amino terminal de lectinas de Leguminosa. Una comparación de la secuencia total deducida mostró una identidad de aproximadamente el 30% y una similitud del 50% con lectinas de Leguminosa como las presentes en *Erythrina corallodendron*, *Robinia pseudoacacia*, *Glycine max*, *Pisium sativu*, *Lathyrus ochrus* y *Cytisus sessilifolius* (Wang et al., 2003a). En el mismo año, fueron descritas las propiedades insecticidas para esta lectina sobre las larvas del escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*), evidenciando que las lectinas de Lamiáceas también pueden tener funciones similares a las descritas para las de la familia Leguminosa (Wang et al., 2003b).

En Colombia, los trabajos realizados sobre Lamiaceae han estado más enfocados a su distribución y clasificación taxonómica (Wood y Harley, 1989; Fernández-Alonso, 1995a, 1995b, 1995c, 2008, 2012). Debido a la información limitada disponible en la literatura sobre las lectinas de Lamiaceae y a la gran biodiversidad de esta familia en Colombia, el GRIP de la Universidad Nacional de Colombia, abordó su estudio hace algunos años. Inicialmente se detectaron lectinas en seis especies (Vega, 1997) con una actividad apreciable por ensayo de ELLSA (Vega, 1997). Posteriormente se estudió la presencia de mucílago de las semillas y su relación con la actividad de lectina por ensayo de ELLSA. La interacción de la lectina con el antígeno Tn aumentó cuando los extractos fueron

previamente tratados con una mezcla de poligalacturonasas (Pectinex®) con la finalidad de degradar solamente el mucilago, ya que interfiere en la actividad de reconocimiento de la lectina. Con estos estudios se detectó la presencia de lectinas anti-Tn, identificando actividad eritroaglutinante en lectinas de 90 especies endémicas y algunas naturalizadas (Fernández-Alonso et al., 2003; Pérez et al., 2006, Fernández-Alonso et al., 2009).

Hasta el momento se han caracterizado parcialmente las lectinas de *Salvia palifolia*, *Hyptis mutabilis* (Filgueira, 2002; Filgueira y Pérez, 2013) y *Lepechinia bullata* (Sanabria, 1999; Rojas, 2004 y Quintero 2006) y se aisló, purificó y caracterizó bioquímica y biológicamente la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I) (Vega, 1997; Vega, 2004; Vega y Pérez, 2006).

La caracterización bioquímica de LSBo-I mostró diferencias apreciables con los datos publicados para LSS, aunque las dos lectinas reconocen específicamente el antígeno Tn. LSBo-I es una glicoproteína (16% carbohidratos neutros) con dos puentes disulfuro intracatenarios. El monómero tiene un peso molecular de 38702 Da y se asocia no covalentemente para formar preferencialmente dímeros y a veces oligómeros mayores (Vega y Pérez, 2006); se estableció la presencia de dos isoformas. La lectina aglutina eritrocitos Tn y es inhibida por muy bajas concentraciones de mucina submaxilar ovina (MSO) (0.019 mM) y mucina submaxilar bovina (MSB) (0.008 mM) corroborando así su especificidad por el antígeno Tn. Tiene un punto isoelectrónico de 8.6-8.8 y la composición de aminoácidos mostró la presencia de cuatro cisteínas y la ausencia de cisteína libre, sin que hubiese podido establecerse su N-terminal por estar probablemente bloqueado.

LSBo-I ha sido utilizada para realizar estudios de histoquímica o inmunohistoquímica en células tumorales y tejidos (Vega, 2004), y producir anticuerpos policlonales en conejo (Vega, 2004) y en gallina (Barroso et al., 2005; Vega et al., 2009). Mediante ensayo de ELISA se evidenció que estos anticuerpos reconocen algunas lectinas de Leguminosas, lo que probablemente indique la presencia de epitopes de secuencia y conformación similares (Vega et al., 2009). Otros trabajos realizados con LSBo-I, mostraron que por cromatografía de afinidad pueden aislarse proteínas citoplasmáticas con alta densidad de antígeno Tn en las líneas celulares HeLa (cáncer de cérvix) y MCF-7 (cáncer de seno), las cuales fueron purificadas utilizando LSBo-I, que reconoce el determinante antigénico Tn. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) se observó la presencia de una banda predominante con peso molecular cercano a 65 kDa. Estas proteínas fueron

reconocidas mediante Western blotting por anticuerpos policlonales dirigidos contra MUC-2 (Torres, 2010).

En trabajos paralelos se determinaron las condiciones de extracción y se realizaron estudios para aislar la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) (Sanabria, 1999), que posteriormente fue caracterizada parcialmente por Rojas (2004) y Quintero, (2006). LLb-I es una glicoproteína con 13.4% de carbohidratos, presenta un peso molecular cercano de 28 kDa por SDS – PAGE y un punto isoeléctrico de 8.5. Adicionalmente se observó que su actividad aglutinante comienza a disminuir sobre los 37°C, y es completamente abolida a 80°C (Rojas, 2004; y Quintero, 2006). Su especificidad por el antígeno Tn fue evaluada y demostrada sobre líneas celulares de cáncer (MCF-7, cáncer de seno; HeLa, cáncer de cérvix) mediante ensayo celular inmuno específico de unión de enzima (CELISA); la interacción se vio inhibida principalmente por asialomucina submaxilar ovina (aMSO) y GalNAc (Rojas, 2004).

Las propiedades de LLb-I son similares a las reportadas para LSBo-I, pero no se ha realizado su caracterización bioquímica en aspectos como composición en amino ácidos, presencia y número de enlaces disulfuro y peso molecular y entre otros, debido a la dificultad en su proceso de purificación.

A pesar de la importancia que tienen las lectinas de Lamiaceae por su reconocimiento por el determinante Tn (Springer, 1997; Munkley, 2016), no hay información estructural suficiente que permita entender cómo es la interacción con el carbohidrato. Tampoco se conocen secuencias de aminoácidos de lectinas relacionadas (por ejemplo del género *Lepechinia*) que posibiliten su clonación para posteriores estudios estructurales y funcionales. La obtención de proteína pura para realizar caracterización estructural de lectinas no es un proceso sencillo, lo que podría explicar el bajo número de lectinas que han sido caracterizadas molecularmente a la fecha (Wang et al., 2033a; Wenping et al., 2015).

4. Metodología

El trabajo experimental se desarrolló en cuatro fases:

- I. Caracterización bioquímica de la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) y comparación con otras lectinas específicas para el antígeno Tn
- II. Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I), específica para el antígeno antígeno T/Tn
- III. Ensayos para la obtención de LLb-I recombinante
- IV. Purificación y caracterización parcial de nuevas lectinas en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

4.1 Fase I. Caracterización bioquímica de la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) y comparación con otras lectinas específicas para el antígeno Tn

4.1.1 Colección de material vegetal

Para purificar la lectina de *Lepechinia bullata* fueron utilizadas semillas maduras que estaban disponibles en el laboratorio de Proteínas. Las semillas fueron previamente colectadas por los Doctores Gerardo Pérez y José Luis Fernández en la región de Manta (Cundinamarca), en cercanías de la escuela Mantagrande. También se colectaron semillas en la vía Arcabuco – Gachantivá (Boyacá), teniendo en cuenta la información disponible en el Herbario Nacional de Colombia. Las especies fueron identificadas por el Doctor José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales e investigador del GRIP y registrada en el Instituto de Ciencias Naturales con los códigos COLO.Boyacá.Arcabuco-Gachantiva-JLF-557667 y COLO.Boyacá.Arcabuco-Gachantiva-JLF-557668.

Las semillas colectadas se aislaron del resto de material vegetal, y se seleccionaron las que presentaban coloración café oscura y consistencia rígida.

4.1.2 Preparación de extractos de proteína total a partir de semillas

Teniendo como base la metodología descrita por Sanabria (1999) y Rojas (2004), se realizó la extracción de proteína a partir de 50 g de semillas de *Lepechinia bullata*. Con el fin de retirar algunos pigmentos, las semillas fueron lavadas con NH_4OH 0.1 M pH 9.4 durante 1 hora, con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con abundante agua destilada, se maceraron y homogenizaron con PBS (20 mM fosfatos, 150 mM NaCl; pH 7.0-7.3) - tioúrea 5 mM como antioxidante, en relación 1:10 (p/v). Los ensayos previos mostraron que la adición de tioúrea reduce notablemente la oxidación enzimática, manteniendo la actividad de la lectina hasta en un 80% por ensayo de ELLSA (Jiménez, 2000).

Las extracciones se hicieron con agitación mecánica durante 8 horas a 4°C y se centrifugaron (15000 rpm) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó a 4°C y el pellet obtenido se volvió a extraer dos veces siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Cada uno de los extractos se almacenó por separado a -20 °C para posteriores ensayos de purificación.

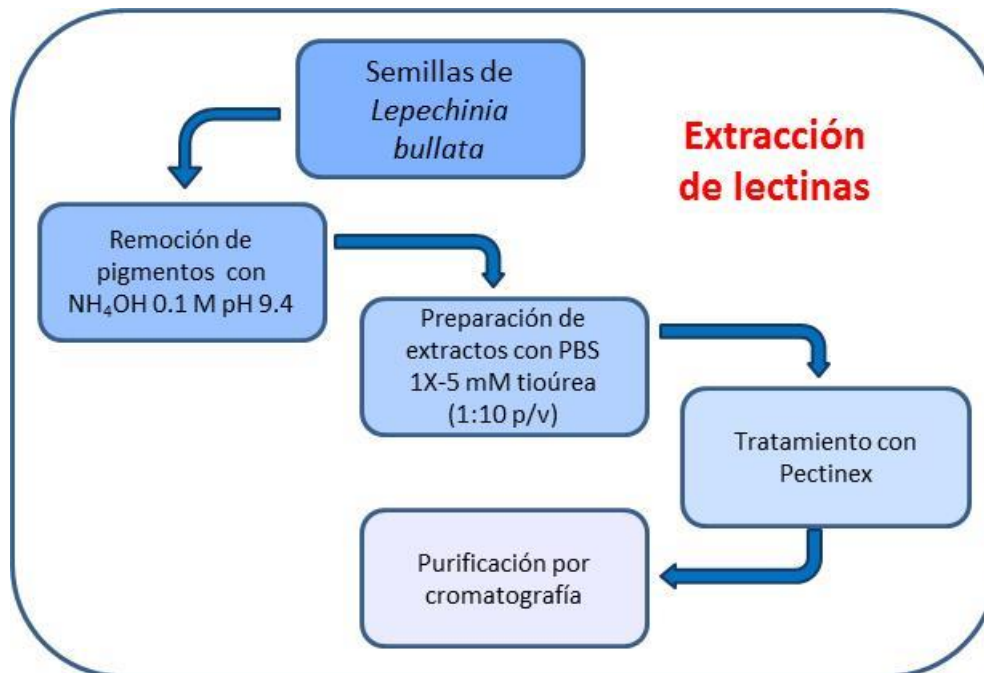
El extracto de *Lepechinia bullata* obtenido durante la primera extracción presentó alta viscosidad (a causa de la presencia de mucílagos en las semillas), por lo tanto se realizó una digestión enzimática con una mezcla comercial de poligalacturonasas (enzimas para la degradación específica de pectinas y mucílagos). Este proceso se llevó a cabo a un pH 4.5 con buffer acetato/ácido acético, adicionando 56 μL de Pectinex® Ultra SP-L (Novozymes corp.) por cada 3 mL de extracto y manteniendo la digestión durante 12 horas a 37°C. Cumplido este tiempo, se centrifugó (15000 rpm) por 30 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 7.0 con NaOH 0.1 M y se almacenó a 4°C para la posterior cuantificación y ensayos de purificación siguiendo la metodología de Rojas (2004).

Con cada uno de los extractos obtenidos se hicieron ensayos de actividad aglutinante utilizando eritrocitos A, B, O y eritrocitos A tratados enzimáticamente para exponer el antígeno T (Gal β 1,3 GalNAc-O-Ser/Thr) y el antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr). También se realizaron ensayos con eritrocitos de conejo. La suspensión de eritrocitos al 2% se

obtuvo según la técnica descrita por Navarro y Pérez (1978). Los eritrocitos Tn se prepararon por degradación enzimática de una suspensión de eritrocitos A⁺ al 10% con 0.05 unidades de neuraminidasa (*C. perfringens* tipo IV), durante 1 h a 37°C para exponer el antígeno T, y posterior degradación con 30 unidades de β-galactosidasa para exponer el antígeno Tn, según el método descrito por Hirohashi et al. (1985), Vega (2004), Vega y Pérez (2006), Pérez y Vega (2007).

La figura 4-1 resume el proceso realizado para la extracción de proteínas a partir de semillas de *Lepechinia bullata*.

Figura 4-1: Proceso realizado para la obtención de extractos proteicos a partir de semillas de *Lepechinia bullata*.



4.1.3 Cromatografía de Intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex para los extractos proteicos

- **Procedimiento I**

Los extractos obtenidos en 4.1.2 fueron aplicados sobre una columna con soporte de DEAE (Dietilaminoetilo)-Sephadex (Farmacia) (2 x 15 cm), equilibrada en PBS. La fracción no retenida se eluyó con PBS 1X (20 mM fosfatos, 150 mM NaCl), mientras que la retenida se eluyó con PBS 1X (20 mM fosfatos, 1 M NaCl). El seguimiento del perfil de

34 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

elución se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 3 mL y midiendo absorbancia a 280 nm; las fracciones que presentaron mayores absorbancias fueron reunidas en un pool. El pool eluido con PBS 1X se denominó “fracción no retenida”, mientras que el eluido con PBS 1X 1 M NaCl se designó “fracción retenida”.

- **Procedimiento II**

Este mismo tipo de cromatografía fue realizada de forma automática por medio del sistema FPLC (Cromatografía líquida de rápida resolución) mediante el purificador Akta (GE Healthcare). Una vez se eluyó con PBS 1X la fracción no retenida, se hizo un gradiente de NaCl desde 0 hasta 1 M. En este caso se utilizó para intercambio aniónico una columna HiTrap™ de 1 mL con soporte de DEAE (GE Healthcare). Se mantuvo un flujo constante de 1 mL/min y cada corrida tomó aproximadamente 80 minutos.

Las fracciones obtenidas por los dos procedimientos fueron concentradas mediante ultrafiltración con Amicón® PM 10 kDa o centrifugación con Centricón® de 10 kDa. A las fracciones retenidas (obtenidas por alta fuerza iónica) se les realizó cambio de buffer mediante ultrafiltración con membrana de 10 kDa y fueron equilibradas en buffer PBS. Las muestras se almacenaron a 4°C para posterior cuantificación, ensayo de aglutinación y purificación de las lectinas.

4.1.4 Cromatografía de afinidad - Síntesis de soportes utilizando diferentes monosacáridos

- **Preparación del soporte de afinidad aMSB – Sepharose 4B**

La mucina submaxilar bovina (MSB) es una glicoproteína de alto peso molecular en la que al ser removido el ácido siálico (desialilación), se expone una alta densidad del antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr).

La desialilación de la MSB (Sigma-Aldrich) se llevó a cabo en HCl 0.01 N a 78°C durante 1 hora (Vega, 2004). Con la aMSB (asialo mucina submaxilar bovina) se realizaron diferentes procedimientos de acople a sepharose 4B. Al final de cada ensayo se determinó el porcentaje de acople y la concentración de mucina en el gel (mg/mL) (Vega, 2004). Las metodologías de síntesis ensayadas se presentan a continuación:

a. Sepharose 4B preactivada con bromuro de cianógeno™ (CNBr): Se acoplaron 3 g de Sepharose 4B preactivada con bromuro de cianógeno™ (GE Healthcare); el soporte se equilibró en bicarbonato de sodio (NaHCO₃ 0.2 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3), obteniendo 10 mL de Sepharose para iniciar el acople. Para la unión se emplearon 10 mL de una solución de concentración 1.3 mg/mL de aMSB en disuelta en bicarbonato de sodio. La reacción se llevó a cabo durante 12 horas a temperatura ambiente; los grupos activos remanentes se bloquearon con una solución de etanolamina 1 M pH 8.0 durante 30 minutos (GE Healthcare, 2009; Hermanson et al., 1992).

b. ECH-Sepharose™ 4B, método de la carbodiimida: Este soporte tiene grupos carboxilo libres al final de un brazo espaciador de 10 átomos de carbono. El acople se realizó utilizando 10 mL de ECH-Sepharose™ 4B (GE Healthcare) resuspendida en 10 mL de una solución de concentración 1.3 mg/mL de aMSB y 0.1 M de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDC) en agua acidificada con HCl hasta pH 4.5. La reacción se llevó a cabo durante 1.5 horas a temperatura ambiente en agua acidificada con HCl hasta pH 4.5 (GE Healthcare, 2006; Hermanson et al., 1992).

c. Sepharose™ 4 Fast Flow preactivada con N-hidroxisuccinimida (NHS): 1 mL de NHS-Sepharose™ 4 Fast Flow (GE Healthcare) fue acoplado con 3 mL de una solución de concentración 1.95 mg/mL de aMSB en buffer bicarbonato de sodio (NaHCO₃ 0.2 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3). La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a temperatura ambiente (GE Healthcare, 2011; Hermanson et al., 1992).

d. Sepharose® 4B, método de aminación reductiva: 1 mL de Sepharose® 4B (Sigma-Aldrich) fue oxidado con metaperiodato de sodio (0.2 M) durante 90 minutos a temperatura ambiente. El soporte fue puesto en reacción con 3 mL de una solución de concentración 1.95 mg/mL de aMSB en buffer bicarbonato de sodio (NaHCO₃ 0.2 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3), y se agregó cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) hasta obtener una concentración 50 mM. La reacción se llevó a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente (Hermanson, 1992).

- **Preparación del soporte de afinidad GalNAc–Sephrose 4B, con activación por divinilsulfona**

Se tomó 1 mL de Sepharose 4B y se equilibró en buffer Carbonato de sodio 0.5 M, pH 11.0. La activación del soporte se realizó por adición gota a gota de 100 μ L de Divinilsulfona, y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 horas. Para el acople se utilizó 1 mL de una solución de N-acetilgalactosamina 0.3 M (Alfa Aesar) (66,4 mg/mL). La reacción se llevó a cabo con agitación suave durante 21 horas a temperatura ambiente, siguiendo la metodología descrita por Hermanson et al. (1992).

Se tomaron 500 μ L de soporte GalNAc-Sephrose 4B y se ensayó su funcionalidad utilizando 300 μ L de lectina de *Galactia lindenii* P2 (previamente obtenida y purificada en el laboratorio de proteínas del GRIP) con una concentración 2.0 mg/mL; esta lectina reconoce el determinante H-2 (Fuc α -(1-2) β -D-Gal(1-4) β -D-GlcNAc) y residuos de lactosa (Almanza et al, 2004). La elución de la fracción no retenida se realizó con PBS 1X, y la fracción retenida con una solución 0.2 M de lactosa en PBS 1X, seguida de una solución de Glicina 50 mM pH 3.0. El seguimiento del perfil de elución se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 μ L y midiendo absorbancia a 280 nm.

- **Cromatografía de afinidad sobre aMSB-Sephrose 4B**

Se siguió la metodología descrita por Rojas, 2004, y Vega y Pérez, 2006. Las fracciones no retenidas obtenidas en 4.1.3. se aplicaron sobre el soporte de aMSB - Sepharose 4B equilibrada en PBS 1X. La cromatografía se realizó con 5 mL de soporte en una columna de 1 x 5 cm; también se empleó una columna de 0.5 x 1 cm empacada con 1 mL de soporte.

La fracción no retenida fue eluida con el mismo buffer de equilibrio (PBS 1X) y la fracción retenida con una solución de Tris-OH (50 mM) pH 11.4. Cada uno de los volúmenes colectados a pH 11.4 se neutralizó rápidamente con HCl 0.1 N.

El seguimiento del perfil de elución se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 μ L y se determinó la absorbancia a 280 nm; las fracciones que presentaron las mayores absorbancias fueron reunidas en un pool. El pool eluido con PBS 1X se denominará de ahora en adelante “fracción no retenida” y el eluido con la solución de TRIS-OH “fracción retenida”. Esta última fracción fue concentrada mediante ultrafiltración

con Centricon® de 10 kDa, y equilibrada en buffer PBS pH 7.2-7.4. Con las dos fracciones se realizaron ensayos de actividad aglutinante sobre eritrocitos Tn.

Las fracciones se cuantificaron por el método del Ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al., 1985) y se almacenaron a -20°C para realizar electroforesis y posteriores y ensayos de aglutinación.

- **Cromatografía de afinidad sobre N-acetilgalactosamina – Sepharose 4B**

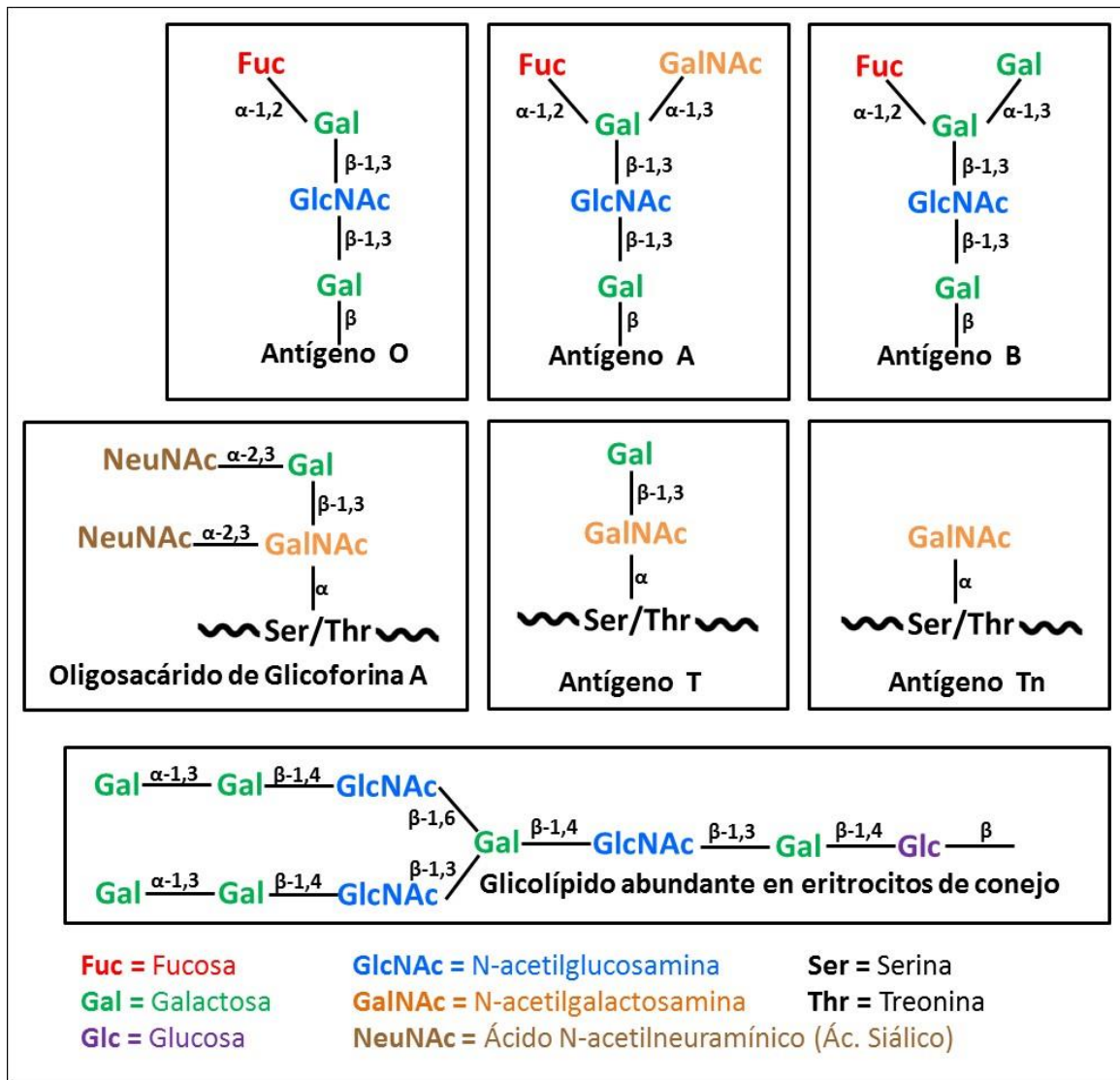
Las fracciones no retenidas obtenidas en 4.1.3 se aplicaron sobre el soporte de N-acetilgalactosamina–Sepharose 4B. La elución de la fracción no retenida se realizó con PBS 1X; posteriormente se adicionó PBS 1X (1 M NaCl) con el fin de eluir moléculas unidas inespecíficamente a la columna. La fracción retenida se eluyó con una solución 200 mM de GalNAc en PBS 1X.

El perfil cromatográfico se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 µL y se midió absorbancia a 280 nm.

4.1.5 Caracterización de las fracciones de proteína obtenidas durante las etapas de extracción y purificación de las lectinas

Los ensayos de aglutinación fueron realizados con eritrocitos de conejo y eritrocitos humanos del sistema ABO, así como eritrocitos tratados enzimáticamente para obtener los determinantes antigénicos T y Tn. La figura 4-2 muestra algunos de los oligosacáridos expuestos en las células ensayadas; unos de los cuales se presentan en forma natural en glóbulos rojos de conejo (Watanabe y Hakomori, 1979) y sistema ABO en eritrocitos humanos. Los determinantes T y Tn y otros se expresan como una glicosilación aberrante en ciertos tipos de células epiteliales tumorales de cáncer (T y Tn) (Juge, 2012; Pinho y Reis, 2015).

Figura 4-2: Estructura de algunos oligosacáridos expuestos en la membrana de eritrocitos, utilizados en los ensayos de aglutinación con lectinas de *Lepechinia bullata*.



(Basada en Watanabe y Hakomori, 1979; Juge, 2012; Pinho y Reis, 2015)

- **Obtención de los eritrocitos**

a. Eritrocitos A, B, O: La suspensión de eritrocitos a partir de sangre tipo A, B y O al 2% se obtuvo según la técnica descrita por Navarro y Pérez (1978), realizando tres lavados sucesivos con PBS 1X y centrifugando a 5000 rpm durante 5 minutos. Cada una de las muestras de sangre fue manipulada teniendo en cuenta las condiciones de bioseguridad.

b. Eritrocitos T. Fueron preparados mediante degradación enzimática de una suspensión de 5 mL de eritrocitos humanos A⁺ al 10% con 0.1 unidades de neuraminidasa (*C. perfringens* tipo IV (Sigma-Aldrich)), durante 2 horas a 37°C para exponer el antígeno T, retirando el ácido siálico presente en glicoforina A (Hirohashi et al., 1985 y Vega, 1997).

c. Eritrocitos Tn. Fueron preparados por degradación enzimática de una suspensión de 2.5 mL de eritrocitos T al 10% con 30 unidades de β-galactosidasa (disponible en el laboratorio de proteínas) durante 4 horas a 37°C para exponer el antígeno Tn retirando la β-galactosa presente en el antígeno T, según el método descrito por Hirohashi et al., (1985) y Vega (1997).

d. Eritrocitos de conejo. A partir de una solución de eritrocitos de conejo al 50% (bioMérieux) se obtuvo una dilución al 4% en NaCl 150 mM. Los eritrocitos fueron tratados con tripsina (proveniente de páncreas porcino; 1000-1500 unidades/mg) (Sigma-Aldrich), papaína (proveniente de látex de papaya; 1.5-10 unidades/mg) (Sigma-Aldrich), o una mezcla de las dos enzimas. Cada uno de los stock de enzimas tenía una concentración de 0.5 mg/mL en PBS 1X.

Para el tratamiento enzimático 2 mL de eritrocitos de conejo al 5% en NaCl 150 mM fueron mezclados con 40 uL de la solución de enzima (0.02 mg de enzima), e incubados 30 minutos a 37°C. Posteriormente se hicieron tres lavados de la suspensión de eritrocitos con NaCl 150 mM.

- **Ensayos de aglutinación**

Las pruebas de eritroaglutinación se realizaron utilizando placas de 96 pozos con fondo cónico, en los cuales se dispusieron 25 µL de PBS, 25 µL de muestra y 50 µL de la suspensión requerida de eritrocitos humanos al 2% o de conejo al 4%. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos (Moreira, 1977). También se realizaron ensayos sobre una lámina portaobjeto con 2, 5 o 10 µL de muestra y el mismo volumen de la suspensión de eritrocitos, permitiendo la acción de la lectina durante 30 segundos antes de cubrirla con laminilla y ser observada al microscopio con un objetivo 10X. Para leer los resultados se estableció una escala cualitativa de +1 a +4, siendo +1 una aglutinación débil y +4 la máxima aglutinación, comparada con el control (Pérez, 1984).

▪ **Cuantificación de proteína**

La concentración de proteínas se determinó durante cada una de las etapas de purificación utilizando el método del ácido Bicinconínico (BCA) en microplaca (Smith et al., 1985; Almanza, 1999). Este método se basa en la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+} en presencia de proteínas (o agentes reductores) en un pH 11.25, generando un complejo de color púrpura que se absorbe a 540 nm. La cuantificación se llevó a cabo en una placa de 96 pozos de fondo plano realizando diluciones seriadas de la muestra y del patrón con Albúmina de Suero Bovina (BSA) (Sigma–Aldrich). (Anexo A).

▪ **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

Con las fracciones obtenidas en cada uno de los pasos de purificación se realizaron electroforesis en geles de 15%, 12.5% ó 10% de acrilamida/bisacrilamida, según los métodos descritos por Laemmli, (1970) (Anexo B) y Schägger y Von Jagow (Anexo C) (1987). Los ensayos se llevaron a cabo en condiciones no reductoras o reductoras usando Ditioneitol (DTT) (40-100 mM) y con calentamiento a 100°C durante 10 minutos. Como patrón de peso molecular se utilizaron Opti-protein XL Marker® (ABM), el cual maneja un rango de proteínas de 245 a 11 kDa; Precision Plus Protein Standards Unstained® (Bio-Rad), con un rango entre 250 y 20 kDa; o una mezcla proteica de Albúmina de Suero Bovino (BSA) (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (31 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa) y lisozima (14 kDa). La corrida se realizó a 100 voltios durante 1.5 horas. Los geles fueron teñidos con Coomassie G-250 o Instant Blue® (Expedeon) y posteriormente analizados con el documentador de imágenes VersaDoc® (Bio-Rad).

▪ **Ultrafiltración con membrana de 10 kDa**

Este método fue empleado para concentrar las fracciones de proteína y hacer cambios de buffer luego de los diferentes procesos cromatográficos. A través de una membrana con un determinado tamaño de poro, pasan las proteínas por medio de una presión ejercida con nitrógeno gaseoso; este proceso se llevó a cabo con agitación permanente y a 4°C. El otro sistema de ultrafiltración es por medio de centrifugación en Centricon®; estos tubos cuentan con una membrana de 10 kDa a través de la cual pasa la muestra en solución, dejando retenidas las moléculas con un tamaño mayor a 10 kDa. Este proceso se realizó a 6000 rpm y 4°C.

4.1.6 Determinación del punto isoeléctrico

▪ Isoelectroenfoque

El método fue realizado en condiciones nativas, empleando un gel de policarilamida al 10% y una mezcla de anfolitos en rangos de pH entre 5-8 y 3-10, en una proporción (5:1) (Bio-Lyte de Bio-Rad). Para la realización de la curva de calibración se trabajó con patrones de punto isoeléctrico Protein mixture® de GE Healthcare, los cuales cubren un rango de pH de 3 a 10. Un patrón de hemoglobina fue corrido al tiempo con las muestras, con el fin de verificar el momento en el que las proteínas se ubican en su punto isoeléctrico (Bollag et al., 1991).

La corrida se llevó a cabo utilizando una solución de ácido fosfórico 0.1 M en el ánodo y una de NaOH 0.1 M en el cátodo. Se hizo una precorrida de 30 min a 200 voltios para enfocar los anfolitos. Posteriormente se sembró la lectina en buffer de muestra y se realizó una corrida a 200 voltios durante 1.5 horas (Anexo D). Finalmente se tiñó con coomassie G-250 y se analizó con el documentador de imágenes VersaDoc® (Bio-Rad).

4.1.7 Determinación de estabilidad (Thermal Shift Assay)

La estabilidad de la proteína es un parámetro importante para conocer durante la etapa de su purificación. Thermal Shift Assay (TSA) es un ensayo que determina la estabilidad térmica de una proteína mediante el uso de un colorante fluorescente (Semisotnov, 1991). Al elevar la temperatura de la proteína se provoca el desplegamiento de su estructura, permitiendo que el colorante se una a los residuos hidrofóbicos y aumente la emisión de fluorescencia. El ensayo se basa en encontrar el “melting protein” o temperatura de melting (T_m) de la lectina, que es calculada a partir de la curva de fusión; entre más alta la T_m (°C) se asume que la proteína es más estable bajo esas condiciones (O'Donoghue, 2009)..

Para este ensayo se utilizó un equipo de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad), en donde se dispuso la placa de 96 pozos con la muestra y el colorante SYPRO® orange (Bio-Rad) en un volumen final de 25 μ L. La muestra se ensayó en tres concentraciones diferentes: 0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL de LLb-I en PBS 1X y la rampa de temperatura utilizada estuvo entre 20 y 100°C, con el fin de encontrar la T_m , con base en la fluorescencia medida (excitación 450-490 nm y detección 560-580 nm). La evaluación de los datos de T_m se realizó mediante el software CFX manager® (Bio-Rad) (Nishiya y Nakano, 2014).

4.1.8 Determinación del reconocimiento de carbohidratos por parte de la lectina

- **Determinación del título de aglutinación**

La actividad hemoaglutinante de la lectina pura (LLb-I) fue evaluada por dilución seriada en microplaca utilizando eritrocitos de conejo o de humano (Moreira, 1977). Para establecer el título específico de aglutinación se realizaron diluciones seriadas de la lectina en PBS 1X con un volumen de 12.5 μL ; posteriormente se adicionaron 12.5 μL de la suspensión de eritrocitos. Los ensayos se llevaron a cabo con eritrocitos de humanos y con eritrocitos T y Tn degradados enzimáticamente, como se describió previamente.

- **Ensayos de inhibición con diferentes azúcares**

El ensayo de inhibición de la aglutinación por carbohidratos fue realizado en una placa de microtitulación. Inicialmente se realizaron diluciones seriadas de la solución de carbohidrato en PBS 1X, dejando 12.5 μL de cada azúcar, y se agregaron 12.5 μL de la lectina en una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Después de 30 minutos se adicionaron 25 μL de la suspensión de eritrocitos de conejo al 4%. La menor concentración de carbohidrato a la cual visiblemente disminuyó la aglutinación se tomó como concentración mínima inhibitoria (Benevides, 2012).

4.2 Fase II. Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I), específica para los antígenos T/Tn

4.2.1 Extracción y purificación de la lectina

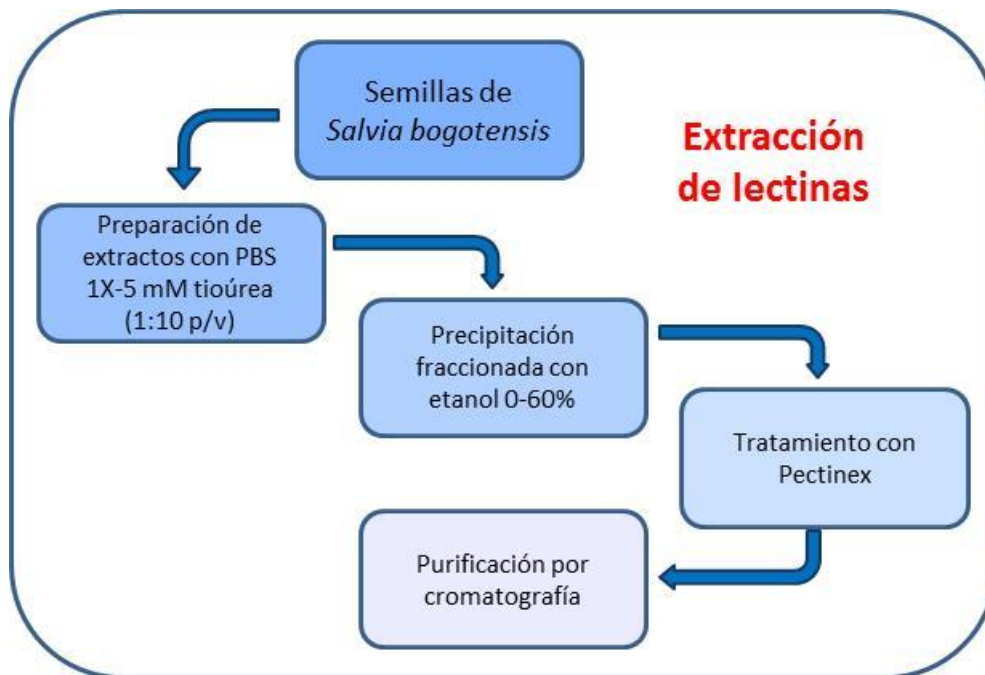
Para la determinación parcial de la estructura primaria de LSBo-I fue necesaria su previa extracción y purificación, partiendo de semillas de *Salvia bogotensis* colectadas en la región de Mondoñedo (Cundinamarca) en la Vía Mosquera – Soacha. La especie previamente fue identificada por el Dr. José Luis Fernández, y registrada en el Herbario Nacional de Colombia con los códigos COL-422764, COL-368928 y COL-420421. Las

semillas se aislaron del resto de material vegetal, y se seleccionaron las que presentaban coloración café oscura.

Los extractos proteicos de *Salvia bogotensis* fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita por Vega y Pérez, (2006). Las semillas fueron trituradas en un molino y 50 g de la harina obtenida se mantuvieron en agitación en buffer PBS – tioúrea 5 mM en relación 1/10 (p/v), durante 8 horas a 4°C. El extracto se centrifugó (15000 rpm) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se almacenó y el pellet se extrajo dos veces más con el mismo procedimiento. Finalmente, los sobrenadantes se reunieron en un único extracto, el cual fue sometido a precipitación fraccionada con etanol frío entre 0-60% . El proceso se llevó a cabo a 4°C y se mantuvo con un goteo lento y constante (1 gota cada 10 segundos) de etanol al 96% frío. Una vez alcanzado el 60% de etanol se dejó el extracto durante una hora sin agitación y posteriormente se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El precipitado se solubilizó en PBS y se mantuvo refrigerado hasta su uso.

Debido a su elevada viscosidad, el extracto fue tratado con Pectinex® para degradar las el mucilago, siguiendo las condiciones descritas anteriormente en 4.1.2. En la figura 4-3 se resume el proceso de extracción de proteínas realizado a las semillas de *Salvia bogotensis*.

Figura 4-3: Proceso realizado para la obtención de extractos proteicos a partir de semillas de *Salvia bogotensis*.



Los extractos obtenidos fueron purificados mediante cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex y posterior cromatografía de afinidad sobre aMSB-Sepharose 4B, como se detalló para LLb-I en los apartados 4.1.3 y 4.1.4 respectivamente.

Las proteínas fueron cuantificadas en microplaca de 96 pozos por el método del BCA (Smith et al., 1985; Almanza, 1999), y se evaluó su capacidad aglutinante sobre eritrocitos A, B, O, T y Tn (Moreira, 1977; Pérez, 1984; Hirohashi et al., 1985 y Vega, 1997). También se realizó SDS-PAGE según el método descrito por Laemmli (1970), procedimientos descritos previamente en el apartado 4.1.5 para LLb-I.

A partir de los geles obtenidos en PAGE, se realizó transferencia de las bandas a membrana PDVF para análisis de la secuencia amino terminal.

4.2.2 Obtención de la secuencia amino terminal

La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Biología Estructural (CEA/CNRS/UJF), en Grenoble (Francia), con la colaboración del Centro de Investigación en Macromoléculas

Vegetales (CERMAV). Se siguió el método descrito por Matsudaira (1987), en el cual las proteínas se transfieren a una membrana de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF) utilizando buffer CAPS (ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico) (10 mM CAPS, 10% metanol) (Anexo E). La determinación de la secuencia de aminoácidos se hizo por el método de degradación de Edman en un secuenciador automático de fase gaseosa (Applied Biosystems, modelo 492). El derivado feniltiohidantoinafeniltiohidantoinado generado en cada ciclo fue identificado y cuantificado por HPLC (Applied Biosystems, modelo 140C), usando un sistema de análisis de datos para secuenciación de proteínas (Software Procise PC v2.1, de Applied Biosystems).

La secuencia deducida fue analizada con blastp de BLAST (Altschul et al., 1990) disponible en NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), buscando encontrar alguna identidad con lectinas. Las comparaciones se realizaron con las modificaciones para secuencias pequeñas (tamaño de la palabra de 2, matriz PAM30, gaps con valor de existencia 9 y de extensión 1, sin ajustes composicionales y sin filtro a las regiones de baja complejidad).

Adicionalmente se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias amino terminal reportadas para las lectinas de *Vicia villosa* (isolectina B₄), *Salvia miltiorrhiza* y *Glechoma hederacea* (Gleheda) mediante Clustal Omega versión 1.2.4 (disponible en <http://www.clustal.org>) (Goujon et al., 2010), utilizando las condiciones por defecto; lo que permitió comparar los residuos presentes en cada una de éstas con los encontrados en LSBo-I.

Con el fin de complementar la información relacionada con la estructura primaria, se llevaron a cabo ensayos para determinar la secuencia parcial de aminoácidos de LSBo-I, mediante digestión enzimática de la lectina en gel de poliacrilamida. Este proceso se realizó en el Instituto de espectrometría de masas en la Universidad Johns Hopkins (Mass Spectrometry and Proteomics Facility, Johns Hopkins University School of Medicine), como se describe a continuación.

4.2.3 Digestión enzimática de la lectina en gel de poliacrilamida

La LSBo-I pura fue resuspendida en buffer MES (Ácido 4-morfolinetanosulfónico sal hemisódica) (20 mM MES, pH 7.4 / 100 mM NaCl / glicerol 4%) y llevada a calentamiento

a 100°C durante 10 minutos. Posteriormente se corrió en un gel denaturante, con rango de concentración de acrilamida de 8-16% (Invitrogen®). Al finalizar la electroforesis se tiñó con azul de coomassie R-250. La banda de proteína fue cortada, y sobre ella fue realizada la digestión enzimática.

Las bandas fueron reducidas con DTT 10 mM por 30 minutos a 56°C y alquiladas con yodoacetamida 55 mM durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las bandas fueron desteñidas realizando dos lavados por 30 minutos con acetonitrilo/bicarbonato de amonio 100 mM (1:1), y luego fueron deshidratadas con acetonitrilo al 100% durante 5 minutos, para finalmente rehidratarlas con la solución enzimática durante 10 minutos (Shevchenko et al, 1996).

Para el tratamiento enzimático se utilizó la enzima Tripsina (Promega. Proveniente de porcino, tratada con TPCK, modificada y resistente a cortes proteolíticos, grado secuenciación), la cual fue resuspendida en una solución de bicarbonato de amonio 25 Mm, a una concentración final de 12.5 ng/μL; La digestión se realizó a 37°C durante 16 horas (Shevchenko et al, 1996 y Shevchenko et al, 2006). Finalmente, los digeridos fueron extraídos del gel con acetonitrilo 50%/TFA 0.1%.

4.2.4 Obtención de la secuencia de los péptidos mediante Cromatografía Líquida – Espectrometría de masas en tándem (LCMS/MS)

Los ensayos para la determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de LSBo-I se realizaron en el Instituto de espectrometría de masas en la Universidad Johns Hopkins (Mass Spectrometry and Proteomics Facility, Johns Hopkins University School of Medicine), como se describe a continuación.

La muestra se limpió utilizando ziptip C18. La mezcla de los péptidos obtenidos se reconstituyó en 10 μL de acetonitrilo 2% / ácido fórmico 0.1%, y se inyectaron 5 μL del digerido triptico.

Los péptidos fueron sembrados en una precolumna C18 de 75 μm x 2.5 cm (YMC*GEL ODS-A 12 nm S-10 μm) a un flujo de 600 nL/min con ácido fórmico 0.1% como solvente A. La separación se hizo a un flujo de 300 nL/min sobre una columna en fase reversa C18 de 75 μm x 100 mm Magic AQ (5 μm , 120Å, Microm Bioresources) usando un gradiente del 3-10% del solvente B (acetonitrilo 90%/ácido fórmico 0.1%) durante los primeros 10 minutos, incrementando posteriormente el solvente B a 30% durante 55 minutos, 45% por 65 min y finalmente 100% por 70min.

Los péptidos eluidos de la corrida cromatográfica fueron enviados en forma de spray hacia el espectrómetro de masas nano-LC-LTQ-Orbitrap-Velos en FTFT mediante una aguja inyectora (New Objective) de 1 μm a 2.0 kV. La adquisición de datos se realizó en un rango de 350-1700 m/z con máximo 10 masas peptídicas (iones precursores) aisladas individualmente a IW1.9 Da, y fragmentadas utilizando energía de activación por colisión HCD 35. El ión precursor y los fragmentos de iones se analizaron a una resolución de 30.000 y 15.000, respectivamente, con parámetros de inclusión dinámica de 30 s, MIPS (monoisotopic ion precursor selection) encendido, la opción m/z apagada y la opción bloqueo de peso molecular encendida con corte en el silocsano (371 kDa).

El análisis se llevó a cabo mediante una búsqueda en Mascot-Scaffold: Mascot 2.2 vía PD1.3 usando RefSeq 2012 como base de datos, teniendo en cuenta como parámetros de búsqueda todas las especies disponibles en la base de datos de tripsina como enzima, un valor del error en clivaje de 2, oxidación de metioninas y deamidación como modificaciones variables, y tolerancia al precursor de 12 ppm y al fragmento de 0.03 kDa.

▪ **Análisis de los datos obtenidos en la secuenciación**

Los datos obtenidos por espectrometría de masas en tándem fueron procesados con el programa Proteome Discoverer (v1.3 Thermo Fisher Scientific) en tres formas diferentes, utilizando 3Nodes: "Common, Xtract y MS2 Processor".

Los resultados obtenidos a partir de 3Nodes fueron analizados con Mascot v.2.2.2 Matrix Science, utilizando:

- Base de datos RefSeq2012, con la opción base de datos concatenados, especificando todas las especies, la tripsina como enzima y un error de corte de valor 2.

- Base de datos Custom sns4 sin especificar la enzima.

Otros parámetros utilizados en ambas búsquedas fueron: Tolerancia a la masa del precursor de 12 ppm, tolerancia a la masa de los fragmentos de 0.03 Da, y la oxidación (M: Metioninas) y carbamidometil (C: cisteínas) como modificaciones variables.

▪ **Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de la LSBo-I**

Tomando los péptidos de novo obtenidos como resultado de la secuenciación, se realizó una disminución de la redundancia utilizando la herramienta Decrease redundancy de EXPASY (Artimo et al., 2012).

Con ayuda de la herramienta blastp de BLAST (Altschul et al., 1990) disponible en NCBI, y utilizando algoritmos diseñados para secuencias cortas (NCBI-BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se realizó una comparación de los péptidos obtenidos contra lectinas de Leguminosa y las reportadas para el reconocimiento del antígeno Tn, buscando secuencias relacionadas para realizar el ensamblaje de los péptidos.

Con base en la información de estructura primaria publicada sobre lectinas de la familia Lamiaceae, la cual corresponde únicamente a dos secuencias reportadas en el NCBI, para la determinación de la secuencia parcial de LSBo-I fueron utilizadas como modelo las secuencias de *Salvia miltiorrhiza* (ABU87404.1 en GenBank) y *Glechoma hederacea* (AAN05097.1 en GenBank).

Se tomaron todos los péptidos luego de eliminar redundancia y se compararon por separado contra las secuencias de *Salvia miltiorrhiza* y *Glechoma hederacea*, con el fin de analizar los alineamientos obtenidos y determinar la posibilidad de hacer una superposición de secuencias según los resultados con las lectinas de las dos especies. Todas las comparaciones se realizaron con las modificaciones para secuencias pequeñas (tamaño de la palabra de 2, matriz PAM30, gaps con valor de existencia 9 y de extensión 1, sin ajustes composicionales y sin filtro a las regiones de baja complejidad). Con los resultados obtenidos se utilizó la secuencia de *S. miltiorrhiza* como molde, teniendo en

cuenta que hubo mayor cubrimiento de las secuencias peptídicas con respecto a esta especie y que el extremo amino terminal se pudo ubicar en la secuencia.

Con la secuencia obtenida se procedió a realizar un alineamiento múltiple contra las lectinas de *Salvia miltiorrhiza* y *Glechoma hederacea* utilizando la herramienta "Clustal Omega" disponible en <http://www.clustal.org>, lo que permitió asignar algunos aminoácidos en posiciones en las que no se había logrado determinar el residuo correspondiente. La secuencia obtenida fue utilizada para realizar una aproximación a la estructura terciaria.

4.2.5 Aproximación a la estructura terciaria de LSBo-I

Mediante herramientas bioinformáticas se realizó el modelamiento de la secuencia obtenida anteriormente, con el fin de identificar el tipo de estructuras secundarias presentes, la similaridad con otras estructuras reportadas en el PDB y los posibles ligandos, entre otras características. Para el proceso se utilizó el programa I-Tasser Server disponible en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/>, que permite generar un modelo con base en múltiples estructuras de referencia y una optimización iterativa de alineaciones alternativas. Se realizó la comparación y selección de modelos de acuerdo con el mejor resultado (score) (Zhang, 2008; Roy et al., 2010; Yang et al., 2013; Yang y Zhang, 2015a; Yang et al. 2015b.).

Para evaluar el modelo más adecuado se utilizaron los parámetros de I-Tasser, que arrojan una puntuación (C-score) que va desde -5 a 2, indicando la calidad de los modelos generados; mayor puntuación indica mejor predicción en la estructura. TM-score y el RMSD son parámetros utilizados para indicar la cercanía del modelo generado con la estructura nativa del molde. TM-score mayor que 0,1 significa un modelo que presenta una topología correcta (Banerjee et al, 1996; Zhang 2008; Roy et al., 2010).

Adicionalmente, se realizó una superposición de modelos tridimensionales de las lectinas de *Salvia bogotensis* (lectina - I), *Salvia miltiorrhiza* y *Vicia villosa* (isolectina B₄), utilizando la herramienta UCSF Chimera (disponible en <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), que permite visualizar alineamientos múltiples de secuencias y estructuras asociadas (Pettersen et al., 2004).

Por otro lado y teniendo en cuenta los resultados del modelamiento, la secuencia determinada fue analizada mediante una Simulación de Acoplamiento Molecular “Docking”, la cual permite la determinación de la estructura molecular de complejos formados por un ligando y una proteína (para este caso, un carbohidrato y una lectina). Los algoritmos para Docking permiten la búsqueda de interacciones o configuraciones favorables (conformación-orientación) entre el ligando y la lectina hasta encontrar un complejo energéticamente estable (Lengauer y Rarey, 1996).

El análisis de las interacciones y afinidad de unión de los carbohidratos con la lectina se realizó mediante “Autodock Vina” (disponible en <http://vina.scripps.edu/>), que realiza una exploración basada en la curvatura de la superficie de energía potencial, permitiendo un alto rendimiento, mayor precisión y facilidad de uso (Trott y Olson, 2010).

Para realizar los acoplamientos fue necesario hacer una preparación de la estructura de LSBo-I y los ligandos usando la interfaz gráfica Autodock tools. A los modelos estructurales obtenidos por I-Tasser, se asignaron los átomos de hidrógeno y las cargas formales. Se generó una caja de cribado o “Grid Box” con dimensiones específicas centrada en la secuencia de interés de la lectina como blanco para el Docking. Las configuraciones de la caja de cribado para cada par ligando-lectina fueron las mismas y se muestran a continuación:

Las coordenadas utilizadas para el posicionamiento de la caja fueron:

Centro en X = 50.916

Centro en Y = 74.862

Centro en Z = 58.714

Para el tamaño de la caja se usaron valores en X = 52, Y= 42 y Z = 54.

Los resultados que arrojó Autodock Vina fueron visualizados en Autodock Tools v.1.5.6. y corresponden a los mejores acoplamientos (configuración y orientación) con valores de energía de unión más bajos en Kcal/mol, junto con los valores de la desviación de la media cuadrática o RMSD (root-mean-square deviation) entre conformaciones.

4.3 Fase III. Ensayos para la obtención de una lectina recombinante de LLb-I

4.3.1 Colección de material vegetal

Las semillas de *Lepechinia bullata* fueron colectadas de plantas ubicadas en el kilómetro 4.5 margen izquierdo, vía Arcabuco - Gachantivá (Boyacá). La especie fue identificada previamente por el Dr. José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales e investigador del GRIP, y registrada en el Herbario Nacional de Colombia con los códigos COLO.Boyacá.Arcabuco-Gachantiva-JLF-557667 y COLO.Boyacá.Arcabuco-Gachantiva - JLF-557668. Los especímenes se colectaron en estado inmaduro, se limpiaron y almacenaron en crioviales y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su procesamiento y análisis.

4.3.2 Extracción de ARN a partir de semillas de *Lepechinia bullata*

La extracción de ARN se realizó a partir de semillas inmaduras de *Lepechinia bullata*, utilizando diferentes opciones disponibles comercialmente, como se explica a continuación. Los ensayos se llevaron a cabo a partir de aproximadamente 100 mg de semillas previamente lavadas, almacenadas a -80°C las cuales fueron pulverizadas con nitrógeno líquido. Los materiales que se usaron para el proceso fueron lavados en agua tratada con Dietil pirocarbonato (DEPC) y jabón anti ARNasas, fueron colocados a -20°C durante al menos 12 horas. En cada caso, se siguió el protocolo recomendado por cada fabricante, como se describe a continuación:

- *TRI Reagent*®, de Sigma–Aldrich. El trizol® es un producto listo para usarse en el aislamiento de ARN a partir de células y tejidos. Se basa en una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina que permite lisar y disolver los componentes de la muestra de partida manteniendo la integridad de los ácidos nucleicos. Un paso posterior de adición de cloroformo y centrifugación, permite la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica), dejando el ARN en la fase acuosa exclusivamente para así poderlo recuperar

mediante lavados sucesivos y precipitación con alcohol isopropílico. (<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>)

- *Direct-zolTM RNA miniprep*, de Zymo research. Esta metodología se realiza directamente a partir de la muestra inmersa y tratada con TRI Reagent®. La solución obtenida se dispone dentro de mini columnas y posteriormente se realizan lavados y elución de ARN total mediante centrifugación, sin necesidad de hacer posteriores separaciones o precipitaciones (<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/467/r2050i.pdf>)

- *AurumTM Total RNA Fatty & Fibrous tissue kit*, de Bio-Rad. Este sistema permite la extracción de RNA total a partir de muestras con alto contenido graso y fibroso, o con una elevada cantidad de ARNasas, a pesar de la interferencia que estos componentes generan sobre la obtención de ARN de buena calidad. Tomando como base la metodología del TRI Reagent®, la fase acuosa es dispuesta sobre mini columnas con membrana de sílica que tienen afinidad por ARN, lo que genera la unión de este ácido nucleico y permite posteriores lavados y tratamiento con ADNasa. Finalmente se recupera el RNA mediante el paso de una solución eluyente por la mini columna. (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001298.pdf>)

- *Total RNA isolation from plant tissue or filamentous fungi*, de Macherey-Nagel. Este protocolo se recomienda para la extracción de RNA total a partir de tejidos vegetales o de hongos, que tienen una alta viscosidad en el momento de ser lisados. Contiene una variedad de soluciones que inactivan ARNasas, protegiendo la estabilidad del ARN. A diferencia de los anteriores, no requiere tratamiento previo con TRI Reagent®, pero sí utiliza una membrana de sílica contenida en mini columnas para anclar los ácidos nucleicos, permitiendo lavados sucesivos, tratamiento con ADNasa y finalmente, la elución del ARN (Macherey-Nagel, User manual, 2012).

- *Dynabeads mRNA DIRECTTM Micro Kit*, de Life Technologies. A diferencia de los anteriores, este ensayo permite la extracción directa de ARN mensajero (ARNm), fundamentándose en la presencia de poliadeninas en el extremo 3' de su secuencia, las cuales se unen específicamente a oligo (dT)s anclados a perlas magnéticas que facilitan los lavados y la recuperación del mensajero sin contaminantes, mediante el uso de

gradillas magnéticas. Esta técnica no requiere extracción previa de ARN total (Invitrogen, Handbook, 2007).

La integridad del ARN obtenido con cada uno de los protocolos, se analizó en gel de agarosa (Alpha Aesar®) al 1 %, teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific); para ello se emplearon 5 µL de la muestra con 1 µL de buffer de carga (BlueJuice® loading Buffer de Invitrogen). El marcador de pares de bases utilizado fue Ready to load ZR 100 bp DNA marker® de Zymo Research.

El ARN obtenido se retrotranscribió inmediatamente por PCR; en el caso de quedar muestra remanente se almacenó a -70°C hasta su posterior uso.

4.3.3 Síntesis de cDNA

Como paso previo a la síntesis de primera hebra, el ARN obtenido se trató con ADNasa (RNase-Free DNase I®, de Epicentre) utilizando las siguientes cantidades:

DNase I	1 µL
Buffer 10X para DNase I	1 µL
ARN	10 µL

La mezcla de trabajo se llevó a 37°C durante 10 minutos y posteriormente se mantuvo a 10°C durante 5 minutos.

A partir del ARN obtenido en el paso anterior y utilizando oligo(dT) como iniciador, se llevó a cabo la síntesis de primera cadena de ADN (cDNA) mediante el uso de un termociclador convencional (Krug y Berger, 1987), utilizando la técnica de transcripción reversa (RT-PCR) (Gilboa et al., 1979, Picknett y Brenner, 2003). Para este proceso se utilizó el sistema comercial *RevertAid™ first strand cDNA Synthesis Kit* de Thermo Scientific, el cual permite la síntesis de primera hebra a partir de ARN total, mARN o ARN específico, mediante el uso de una transcriptasa reversa. El kit contiene inhibidor de ARNasas, lo que protege la integridad del ARN de trabajo. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante, a partir del ARN total obtenido de las semillas de *Lepechinia bullata*. (https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ MAN0012716 _RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf)

54 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

Se preparó una solución de trabajo a un volumen final de 20 μ L con las siguientes cantidades:

ARN tratado con ADNasa	10 μ L
Oligo dT	2 μ L
Buffer de reacción 5X	4 μ L
Inhibidor de ARNasas	1 μ L
Mezcla dNTPs 10 mM	2 μ L
Transcriptasa reversa	1 μ L

La mezcla se mantuvo durante 1 hora a 40°C, posteriormente se llevó a 70°C durante 5 minutos, y para finalizar se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

4.3.4 Amplificación de fragmentos de ADN

Este proceso se llevó a cabo mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Saiki et al., 1988), utilizando la enzima Taq DNA Polimerasa de Invitrogen® para la amplificación.

Debido a la escasa información sobre secuencias nucleotídicas y la estructura primaria para lectinas de Lamiáceas, la amplificación se realizó utilizando como iniciadores juegos de primers previamente diseñados en un trabajo de lectina de *Calopogonium galactoides* con base en secuencias reportadas de lectinas vegetales (Alvarado et al., datos no publicados) (Tabla 4-1). Las especies sobre las que se hizo el diseño fueron seleccionadas por presentar lectinas con reconocimiento por galactosa, N-acetilgalactosamina, manosa o glucosa, tal es el caso de *Glycine max*, *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia gladiata*, *Cymbosema roseum*, *Dioclea grandiflora*, *Sophora japónica* y las dos especies de Lamiáceas a las que se les ha reportado la secuencia de sus lectinas (*Gelchoma hederacea* y *Salvia miltiorrhiza*).

Para realizar el diseño de primers, inicialmente se hizo un BLAST (Altschul et al., 1990) de cada una de las secuencias mencionadas anteriormente contra otras reportadas para lectinas, con el fin de obtener una secuencia consenso que abarcara el gen lo más

completo posible, y diseñar los primers desde los dos extremos de cada gen reportado (desde el amino hasta el carboxilo terminal). Posteriormente se utilizó el programa Primer3 disponible en NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para el diseño de primers forward y reverse de un tamaño entre 20 y 23 nucleótidos.

Tabla 4-1: Primers utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN proveniente de semillas de *Lepechinia bullata*.

	Primer Forward	Primer Reverse
GmGal	TTAGATGGCCTCATTGAGCA	ATGGCCACCTCCAACCTTCTC
Cemn	AAATCCTCCCTGTTCCCTCC	CCGGGATCTCATTGCTCTT
Can	ATCTCAAAGAATCCTCCCTGTT	GGGATCTCATTGCTCTTCAACTT
Craty	GCTCATACTATTGTTGCTGTTGAA	AGCATCTGGAAAAAGTCCAAGA
Cym	TTCTTCTTCTGATCTTACTCTTCAA	AAAGTCCAGTAGGCAGTCTTTCCA
Dio	TGATAGTAGTGAGCAGGGTGAGC	TAAAGACCGTTGTAGCAGAAAG
Dgf mn	GGGTGAGCTCATCAATAGCA	CCGGTTGTAGCAGAAAGACC
Soja	TTTTACAGATGAGCAGTTTGACC	TACCTCCAACCTCAAGACCAAC
Lam	CTTCGACCCTAATGATACCTCA	CGGTGAACTCCCAATAGTTAAT

GmGal: *Glycine max*; Cemn: *Canavalia ensiformis*; Can: *Canavalia brasiliensis*; Craty: *Canavalia gladiata*; Cym: *Cymbosema roseum*; Dio y Dgf mn: *Dioclea grandiflora*; Soja: *Sophora japonica*; Lam: *Glechoma hederacea*.

Para realizar la amplificación de fragmentos con base en los primers anteriores, se preparó una solución de trabajo a un volumen final de 50 µL con las siguientes cantidades:

cADN	5 µL
Buffer para PCR 10X	5 µL
MgCl ₂ 25 mM	4 µL
Mezcla dNTPs 10 mM	1 µL
Primer Forward	1.5 µL
Primer Reverse	1.5 µL
Taq polimerasa (5U/ µL)	0.5 µL
Agua estéril	31.5 µL

En la tabla 4-2 se describe el programa utilizado para la amplificación de ADN en el termociclador. Cada juego de primers se ensayó a diferentes temperaturas de hibridación entre 57 y 62°C, con variaciones de 0.5°C.

Tabla 4-2: Programa de PCR para la amplificación de fragmentos de ADN proveniente de semillas de *Lepechinia bullata*.

1. Denaturación Inicial	94°C	3 min	1 ciclo
2. Denaturación	94°C	45 seg	34 ciclos
3. Hibridación	***	45 seg	
4. Elongación	72°C	1 min	
5. Extensión final	72°C	5 min	1 ciclo
6. Almacenamiento	4°C	α	1 ciclo

*** La temperatura de hibridación varió entre 57°C y 62°C.

El producto amplificado se analizó en gel de agarosa (Alpha Aesar®) al 1.5%, teñido con SYBRr® Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific), sembrando 9 µL de la muestra con 1 µL de buffer de carga (BlueJuice® loading Buffer de Invitrogen). El marcador de pares de bases utilizado fue Ready to load ZR 100 bp DNA marker® de Zymo Research. Lo anterior con el fin de determinar el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos y conocer preliminarmente la eficiencia de la amplificación. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

4.3.5 Secuenciación del ADN amplificado

El producto amplificado se purificó mediante el kit comercial *Zymoclean™ Gel DNA Recovery kit*, de Zymo research, diseñado para purificar fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, usando cartuchos que contienen membranas de sílica para capturar y purificar el fragmento de ADN. (<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/184/d4001d.pdf>). Posteriormente, el fragmento de ADN amplificado y puro se envió al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia – SsiGMol, en donde las muestras son procesadas empleando la química del *BigDye® Terminator* de Applied Biosystems (que utiliza el método Sanger) y son corridas en un Analizador Genético Applied Biosystems 3500 con capacidad de lectura de secuencia de aproximadamente 1,000 pares de bases. La secuenciación Sanger utiliza la terminación específica con cuatro fluorocromos diferentes, lo que permite la realización de secuenciación en una reacción.

Con ayuda de la herramienta blastn de BLAST (Altschul et al., 1990) disponible en NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se realizó una comparación de las secuencias obtenidas contra las reportadas en bases de datos, buscando encontrar alguna identidad con lectinas vegetales.

4.4 Fase IV. Purificación y caracterización de nuevas lectinas en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

4.4.1 Cromatografía de afinidad

Algunos de los soportes se obtuvieron comercialmente, y se realizaron las cromatografías utilizando 1 mL de cada uno. Los ligandos fueron manosa (D-Manosa–agarosa (Sigma-Aldrich)), fucosa (α -L-Fucosa-agarosa (EY laboratorios INC.)), N-acetilglucosamina (N-acetil-D-glucosamina–agarosa (Sigma-Aldrich)) y galactosa (Sepharose 4B (Sigma-Aldrich)). Otros soportes cromatográficos fueron preparados en el laboratorio de proteínas, como se describe a continuación.

a. Preparación del soporte de afinidad Manosa – Sepharose 4B. Se tomaron 5 mL de Sepharose 4B y se equilibraron en buffer Carbonato de sodio 0.5 M, pH 11.0. La activación del soporte se realizó por adición gota a gota de 500 μ L de Divinil Sulfona, y se mantuvo a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 horas. Para el acople se utilizaron 5 mL de una solución de D(+)-manosa 3 M (Sigma-Aldrich) (54 mg/mL). La reacción se llevó a cabo con agitación suave durante 21 horas a temperatura ambiente, siguiendo la metodología descrita por Hermanson et al. (1992).

Se tomaron 0.5 mL de soporte Manosa-Sepharose 4B y se ensayó su funcionalidad utilizando 500 μ L de Concanavalina A (previamente obtenida y purificada en el laboratorio de proteínas del GRIP) con una concentración 7.2 mg/mL; esta lectina reconoce residuos de manosa, así como oligosacáridos ricos en manosa (Olson y Liener, 1967). La elución de la fracción no retenida se realizó con una solución de NaCl 1% conteniendo 5 mM Ca⁺⁺

y 5 mM Mn⁺⁺, y la fracción retenida con una solución 0.2 M de Glucosa en NaCl 1%. El seguimiento del perfil de elución se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 µL y midiendo absorbancia a 280 nm.

b. Preparación del soporte de afinidad Concanavalina A – Sepharose 4B. Se acoplaron 3 g de Sepharose 4B preactivada con bromuro de cianógenoTM (GE Healthcare). El soporte se equilibró en 3 mL de bicarbonato de sodio (NaHCO₃ 0.2 M, NaCl 0.5 M, pH 8.3). Para la unión del ligando se emplearon 10 mL de una solución de concentración 7.2 mg/mL de Con A en buffer bicarbonato de sodio. La reacción se llevó a cabo durante 12 horas a temperatura ambiente; el grupo activo remanente se bloqueó con una solución de etanolamina 1 M pH 8.0 durante 30 minutos (GE Healthcare, 2009; Hermanson et al., 1992). El soporte se equilibró en una solución de NaCl 1% (5 mM Ca⁺⁺, 5 mM Mn⁺⁺).

- **Cromatografía de afinidad sobre diferentes soportes**

Las fracciones retenidas de *Lepechinia bullata* obtenidas en 4.1.3 se aplicaron sobre cada soporte, cuyo ligando es uno de los monosacáridos mencionados anteriormente. La elución de la fracción no retenida se realizó con PBS 1X; posteriormente se adicionó PBS 1X (1 M NaCl) con el fin de eluir moléculas unidas inespecíficamente a la columna. La fracción retenida se eluyó con una solución 200 mM del azúcar correspondiente en PBS 1X: D-(+)-Manosa (Sigma-Aldrich), L-Fucosa (AppliChem®), N-acetil-D-glucosamina (AppliChem®), PBS D-(+)-Galactosa (Sigma-Aldrich), según cada caso.

El perfil cromatográfico se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 µL y midiendo absorbancia a 280 nm; las fracciones que presentaron las mayores absorbancias fueron reunidas en un pool. El pool eluido con PBS 1X se denominó “fracción no retenida” y la fracción eluida con el azúcar “fracción retenida”. En el caso de la afinidad sobre Sepharose 4B-Manosa, se empleó una columna empacada con 2 mL de soporte; la fracción retenida se eluyó con soluciones de 200 mM de D-(+)-Manosa (Sigma-Aldrich) seguida de 200 mM de una solución de α-metil-manopiranososa (Alfa AesarTM).

Las muestras se concentraron por ultrafiltración en membrana de 10 KDa mediante Centricon®, y fueron equilibradas en PBS 1X. Cada una de las fracciones obtenidas y concentradas se almacenó a -20°C para electroforesis y análisis posteriores.

a. Cromatografía de afinidad sobre Manosa-Sepharose 4B. La fracción retenida de la cromatografía de intercambio aniónico obtenida en 4.1.3 se aplicó sobre una columna de Sepharose 4B-manosa. La elución de la fracción no retenida se realizó con PBS 1X, posteriormente se adicionó PBS 1 X 1M NaCl con el fin de eluir moléculas unidas inespecíficamente al soporte, y finalmente la fracción retenida con soluciones de 200 mM de D-(+)-Manosa (Sigma-Aldrich) seguida de 200 mM de una solución de α -metil-manopiranososa (Alfa aesar™). El seguimiento de la elución se realizó colectando volúmenes de 500 μ L y midiendo absorbancia a 280 nm; los que presentaron mayores absorbancias fueron reunidos en un pool. El pool eluido con PBS 1X es la racción no retenida, y el eluido con el azúcar se denominó racción retenida.

b. Cromatografía de afinidad sobre Sephacryl S-200. La fracción retenida de la cromatografía de intercambio aniónico obtenida en 4.1.3 se aplicó sobre una columna (12 x 0.5 cm), empacada con 5 mL de sephacryl S-200 HR (Sigma–Aldrich), soporte que tiene residuos glucosa en su estructura. La elución de la fracción no retenida se realizó con PBS 1X, posteriormente se adicionó PBS 1 M NaCl con el fin de eluir moléculas unidas inespecíficamente al soporte y finalmente la fracción retenida se eluyó con una solución 200 mM de D-(+)-Manosa (Sigma-Aldrich). El seguimiento de la elución se realizó colectando volúmenes de 500 μ L y midiendo absorbancia a 280 nm; las fracciones que presentaron las mayores absorbancias fueron reunidas en un pool. El pool eluido con PBS 1X es la fracción no retenida, y el eluido con el azúcar se denominó fracción retenida.

c. Cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A – Sepharose 4B. Con base en el conocimiento de que lectinas tipo I descritas en diferentes especies de Leguminosas y que presentan un oligosacárido en su estructura, son reconocidas por Concanavalina A (Pérez, et al., 1990; Sierra y Pérez, 1999; Melgarejo et al. 2005), se utilizó este soporte para aislar las lectinas de Lamiáceas (Vega, 1997). Las fracciones retenidas en DEAE (4.1) fueron equilibradas en NaCl 1% (5 mM Ca⁺⁺, 5 mM Mn⁺⁺) y se sembraron sobre una columna de 2.5 mL de Con A-Sepharose 4B. Se utilizaron columnas diferentes para cada especie (*Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*).

La fracción no retenida se eluyó con la solución de equilibrio. Una primera fracción retenida se obtuvo por elución con Glucosa 0.2 M en NaCl 1% (5 mM Ca⁺⁺, 5 mM Mn⁺⁺) y una

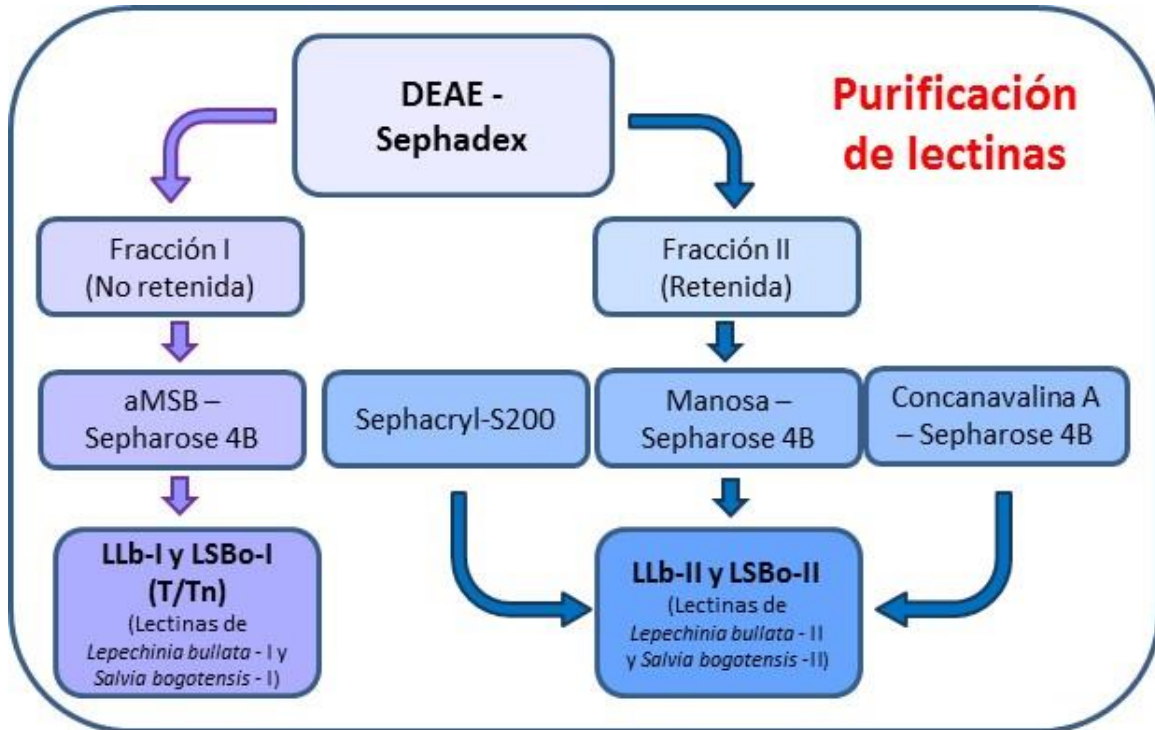
segunda fracción retenida se eluyó con buffer Gly-HCl (50 mM) pH 3.0. El seguimiento del perfil cromatográfico se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 μ L y midiendo absorbancia a 280 nm; los que presentaron mayores absorbancias fueron reunidos en un pool. El pool eluido con NaCl 1% (5 mM Ca⁺⁺, 5 mM Mn⁺⁺) es la fracción no retenida, mientras que las fracciones eluidas con Glucosa 0.2 M y con Gly-HCl (pH 3.0) son las fracciones retenidas I y II respectivamente.

Las fracciones retenidas obtenidas de los diferentes procesos de purificación fueron ultrafiltradas en membrana de 10 kDa mediante Centricon®, y fueron equilibradas en PBS 1X. Posteriormente cada una de ellas se almacenó a -20°C para posteriores análisis.

La caracterización de cada una de las fracciones se hizo siguiendo la metodología descrita 4.1.5 y 4.1.6.

La figura 4-4 sintetiza el proceso que se llevó a cabo para purificar las dos lectinas de cada una de las especies trabajadas en este estudio. Tanto en *Lepechinia bullata* como en *Salvia bogotensis* el procedimiento realizado fue el mismo. En este diagrama se incluye el proceso cromatográfico para la obtención de la lectina I (que presenta reconocimiento del antígeno T y Tn), y de la lectina II (aislada mediante Concanavalina A), partiendo de la cromatografía de intercambio iónico (descrita en el apartado 4.1.3) y pasando por la cromatografía de afinidad sobre aMSB-Sepharose 4B (apartado 4.1.4). o sobre Concanavalina A-Sepharose 4B (apartado 4.4.1 c).

Figura 4-4: Síntesis del proceso de obtención de las lectinas presentes en *Lepechinia bullata* y en *Salvia bogotensis*.



4.4.2 Determinación del punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico de las lectinas LLb-II y LSBo-II fue determinado en gel de poliacrilamida al 10%, siguiendo las condiciones descritas en el numeral 4.1.7 (Bollag et al., 1991).

4.4.3 Detección de glicoproteínas

Con el fin de establecer la presencia de proteínas glicosiladas, se realizó un ensayo de detección cualitativo según protocolo descrito por Bio-Rad (Vega, 1997).

Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% con el método Tris-tricina según las condiciones descritas previamente (4.1.5), sembrando 20 µg de proteína en cada pozo y utilizando la ovoalbúmina como control positivo. Posteriormente se realizó transferencia semihúmeda de las proteínas a una membrana de Nitrocelulosa (Bio-Rad), utilizando el equipo Trans-Blot® SD (Bio-Rad). Las condiciones de transferencia fueron 25 Voltios, 130 mA., 5 Wat. y 30 min. Una vez completado el proceso, una parte de la membrana, previamente definido como control de transferencia, fue teñido con rojo

ponceau para evidenciar la transferencia de las proteínas y los marcadores de peso. Paralelamente, la membrana con las lectinas fue oxidada con metaperyodato de sodio 30 mM, lavada e incubada con biotina-hidrazina (1.3 mM) en buffer acetato-acético (100 mM pH 5.0-5.5) durante 1 hora. A continuación se bloqueó con PBS:BSA 1.3% durante toda la noche a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó una incubación con estreptavidina-peroxidasa 1:500 durante 1 hora, finalizando con el revelado mediante 3'3'-diaminobenzidina tetrahidroclórico (DAB) (Sigma-Aldrich) 0.5 mg/mL a 30°C con adición de peróxido de hidrógeno. La membrana se mantuvo en la solución de revelado hasta que las bandas fueron observadas, en ese momento se lavó con agua destilada para detener la reacción (Anexo F).

4.4.4 Obtención de la secuencia amino terminal

El proceso llevado a cabo para la secuenciación del extremo amino terminal de las lectinas se realizó con las condiciones descritas en el apartado 4.2.4.

5. Resultados y análisis

5.1 Caracterización bioquímica de la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) y comparación con otras lectinas específicas para el antígeno Tn

5.1.1 Extracción y purificación de la lectina

- **Colección de semillas de *Lepechinia bullata***

Con base en información previa del Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP) se realizó una búsqueda de *Lepechinia bullata* en regiones de Cundinamarca y Boyacá, ubicándola en el kilómetro 4.5 margen izquierdo en la vía Arcabuco - Gachantivá (Boyacá). En la figura 5-1 se muestra la fotografía de uno de los especímenes encontrados.

Figura 5-1: Espécimen de *Lepechinia bullata* encontrado en la vía Arcabuco-Gachantivá (Boyacá).



La identificación de la especie fue realizada por el Dr. José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales e investigador del GRIP. Las muestras colectadas fueron identificadas en el Herbario Nacional de Colombia quedando registradas con los códigos COLO.Boyacá.Arcabuco-Gachantiva-JLF-557667 y COLO.Boyacá.Arcabuco-Gachantiva -

JLF-557668. La colección se realizó en los meses de julio y diciembre, en los cuales se observó que la planta se encontraba con abundancia de racimos y alta producción de semillas.

En la misma planta fueron encontradas semillas en diferente estado de maduración (Figura 5-2), de tal forma que se colectaron ramas secas en las cuales abundaran semillas maduras; éstas se transportaron al laboratorio de proteínas de la Universidad Nacional, en donde fueron limpiadas para ser utilizadas en la extracción de proteína. Para esta fase del estudio se seleccionaron semillas de mínimo 2 mm de longitud, que presentaran una coloración entre café oscuro y negra, y que su consistencia fuera rígida, lo que garantizaba que se encontraban en estado maduro. Sanabria (1999) realizó la descripción de la selección y obtención de las semillas para extracción.

Figura 5-2: Semillas de *Lepechinia bullata* en distinto estado de maduración.



De izquierda a derecha: Semillas inmaduras (verde), semillas en proceso de maduración (pardo) y semillas maduras (café oscuro-negro).

▪ **Preparación de extractos proteicos a partir de semillas de *Lepechinia bullata***

El lavado de las semillas con NH_4OH 0.1 M pH 9.4, permitió eliminar algunos pigmentos antes del proceso de extracción de proteínas (Sanabria en 1999). Sin embargo, los extractos crudos presentaron una coloración que se acentuó con el paso de los días, por lo que fue necesaria la adición de tioúrea 5 mM al buffer de extracción (PBS), tal como había sido reportado en trabajos anteriores (Sanabria, 1999; Rojas, 2004); de esta forma se inhibió la acción de las polifenoloxidasas (Van Driessche et al., 1983) y se obtuvieron extractos menos pigmentados para continuar los procesos de purificación.

Se hicieron otros ensayos adicionando al buffer de extracción ácido ascórbico 0.1 M, como una alternativa para evitar la oxidación y pigmentación de los extractos, sin embargo, la

longitud de onda en la que esta sustancia absorbe es 265 nm, por lo que en pasos posteriores de purificación se dificultó hacer el seguimiento a la presencia de proteínas. Para remover el ácido ascórbico, la muestra se dializó contra una solución de bicarbonato de amonio 20 mM durante 32 horas con agitación constante a 4°C, realizando tres cambios de la solución de diálisis (uno cada 8 horas). También, la muestra fue ultrafiltrada en Amicón® usando membrana con tamaño de poro 10 kDa, para reducir la concentración del antioxidante. Desafortunadamente, ninguna de las técnicas de separación permitió eliminar el ácido ascórbico de los extractos.

La solución obtenida de la primera extracción con PBS tioréica 5 mM presentó una viscosidad alta, lo que impidió utilizarla directamente en los pasos de purificación y dificultó la realización del ensayo de eritroaglutinación. El tratamiento con la mezcla enzimática de poligalacturonasas (Pectinex®) disminuyó su viscosidad por la degradación de mucilagos. El Pectinex® es una mezcla comercial de pectinasas, conteniendo principalmente poligalacturonasa, pectinliasa y pectinesterasa, enzimas encargadas del rompimiento de sustancias pécticas vegetales. Las enzimas hidrolizan los mucilagos rompiendo el enlace glicosídico α (1,4) tanto en el interior del polímero como en los extremos del mismo (Carvajal, 2007) pero el proceso no afecta ni la estructura ni la actividad aglutinante de la lectina (Rojas, 2004). El efecto de este tratamiento es una mejor interacción de la proteína con los carbohidratos y por lo tanto un incremento de la actividad de la lectina. Estos resultados han sido ampliamente documentados para varias especies (Fernandez-Alonso et al., 2003 y 2006; Pérez et al., 2009). La segunda y tercera extracción se caracterizaron por ser soluciones menos viscosas, por lo tanto no fue necesario realizar tratamiento con Pectinex®.

Partiendo del hecho que los carbohidratos son el blanco de reconocimiento por parte de las lectinas, y que los eritrocitos exponen en su superficie moléculas de carbohidratos, los ensayos de eritroaglutinación se utilizaron como método para determinar la presencia y actividad de las lectinas en el presente estudio (Moreira, 1977). Para este fin se utilizó sangre humana del sistema ABO sin tratar y tratada enzimáticamente para retirar los residuos de ácido siálico (mediante el uso de neuraminidasa) y de β -galactosa (utilizando β -galactosidasa) de la glicoforina A, proteína abundante en la membrana de eritrocitos, lo que permitió obtener los determinantes antigénicos T y Tn (Figura 4-2, capítulo anterior).

La detección de lectinas anti-Tn también se ha llevado a cabo por la técnica de ELLSA (Pérez y Vega, 2007), sin embargo los resultados obtenidos por hemoaglutinación permitieron realizar el seguimiento de la actividad aglutinante. En la tabla 5-1 se presentan los resultados de la cuantificación y de la actividad aglutinante de los extractos de semillas de *Lepechinia bullata*; en la figura 5-3 se observa la eritroaglutinación presentada por extractos proteicos.

Tabla 5-1: Cuantificación y actividad eritroaglutinante de los extractos proteicos obtenidos a partir de semillas de *Lepechinia bullata*.

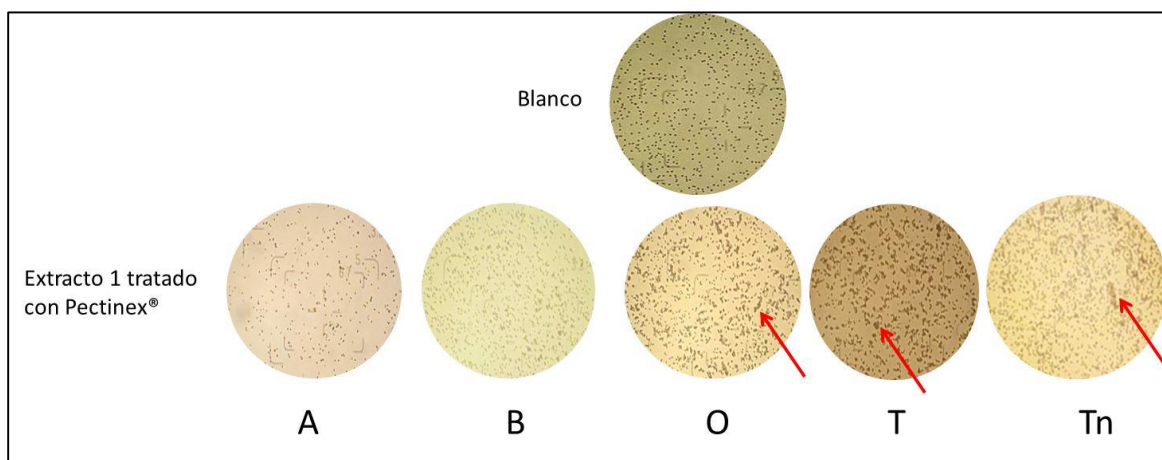
Extracto	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Cantidad total de proteína (mg)	(µg) proteína total	Ensayo de Eritroaglutinación				
					A	B	O	T	Tn
1	351	9.1	3194.1	18.2	-	-	-	-	+/-
1**	277	6.8	1883.6	13.6	-	-	-	+2	+2
2	460	4.9	2254	9.8	-	-	-	+1	+2
3	510	4.1	2091	8.2	-	-	-	+1	+2
** Tratado con Pectinex® Cantidad total de proteína extraída a partir de 50 g de semillas de <i>Lepechinia bullata</i>			6228.6 (12.5%)						

-: Ausencia de aglutinación, +/-: Aglutinación dudosa +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte.

A partir de 50 g de semillas de *Lepechinia bullata* se obtuvieron 6.2 g de proteína total, lo que corresponde al 12.5%, siendo menor que el encontrado por Rojas (2004) con 14.4%. En el caso de *Salvia rubescens*, Aldana (2000) reportó 19.6%, en 2002 Filgueira encontró 15.7% de proteína en *Salvia palifolia*, y Vega (2004) reportó 13.1% en *Salvia bogotensis*. Los datos reportados por Rojas (2004) fueron obtenidos por el método de micro Kjeldahl, mientras que en este trabajo la concentración de proteína fue determinada utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA). En el año 2000, Aldana realizó un estudio en el que comparó estos dos métodos de cuantificación utilizando lectinas de Lamiáceas, encontrando que entre los dos existe una buena correlación en los datos arrojados, por lo tanto, es posible utilizar cualquiera de las dos técnicas. A medida que el trabajo experimental lo requirió, el proceso de extracción volvió a llevarse a cabo en diferentes ocasiones, obteniendo datos similares en lo referente a la cantidad de proteína obtenida y a las características de actividad y viscosidad que presentaron los extractos.

Con respecto a los resultados de aglutinación, se observó actividad con eritrocitos T y Tn con el extracto 1 tratado con Pectinex® y los extractos 2 y 3; la actividad obtenida fue apreciable con cantidades de proteína total entre 8-13 μg , además del reconocimiento hacia el determinante T, lo cual no había sido previamente reportado (Tabla 5-1; Figura 5-3). En otros estudios de detección de lectinas realizados por Bird & Wingham (1974, 1976, 1977, 1982) reportaron la ausencia de lectinas con actividad eritroaglutinante en varias especies de Lamiáceas; posteriormente Fernández-Alonso et al. (2003 y 2009) y Pérez et al. (2006), encontraron actividad aglutinante en esas mismas especies luego del tratamiento del extracto proteico con Pectinex®.

Figura 5-3: Eritroaglutinación de extractos proteicos de semillas de *Lepechinia bullata*.

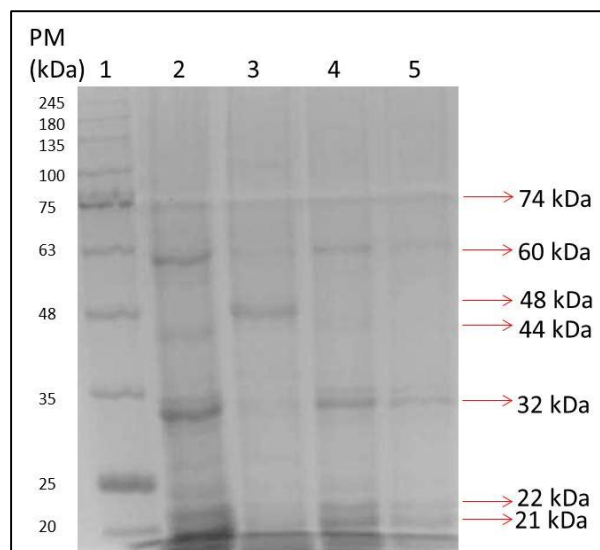


Ensayo de actividad aglutinante realizado con eritrocitos humanos del sistema ABO, y con eritrocitos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo (Objetivo 10x)

Es necesario tener en cuenta que en extractos crudos existe la posibilidad de encontrar algunas otras moléculas diferentes a lectinas como son taninos, ciertos lípidos, sustancias catiónicas y carbohidratos, que pueden interactuar con oligosacáridos, generando aglutinados muy pequeños (Nagano, 2007). También se presentan interferencias con polifenoles y quinonas, que pueden unirse a proteínas (Lonis, 1974), generando una hemaglutinación débil que no es mediada propiamente por las lectinas presentes (Blunden et al., 1986; Rogers y Loveless, 1985).

Por SDS-PAGE (Figura 5-4) se encontraron pocas bandas en el gel para los extractos crudos a pesar de sembrar una alta cantidad de proteína. Los extractos 1, 2 y 3 compartieron el mismo patrón electroforético, evidenciando bandas predominantes cercanas a 22, 32, 45 y 60 kDa; el extracto 1 mostró algunas bandas adicionales en 74, 44 y alrededor de 25 kDa. Para el extracto 1 tratado con Pectinex®, en donde la cantidad de proteína fue más baja, se intensificó una banda cercana a los 48 kDa. Como control se hizo electroforesis con la mezcla de poligalacturonasas (Pectinex®), mostrando en general un barrido no definido (datos no mostrados); sin embargo, las cantidades de Pectinex® usadas para el ensayo de reducción de la viscosidad son muy bajas, como se describió en el apartado 4.1.2.

Figura 5-4: SDS-PAGE de los extractos proteicos de semillas de *Lepechinia bullata*.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 127 µg de extracto 1; carril 3. 95 µg de extracto 1 tratado con Pectinex®; carril 4. 67 µg de extracto 2; carril 5. 57 µg de extracto 3.

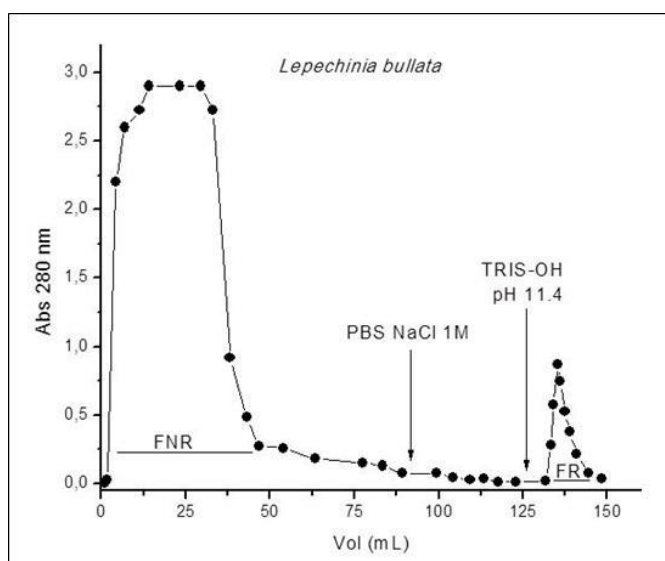
▪ **Cromatografía de Intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex para extractos de semillas de *Lepechinia bullata***

La técnica de cromatografía de intercambio iónico está basada en la separación de componentes de una mezcla mediante interacciones de tipo electrostático entre los analitos y un soporte que tiene grupos cargados eléctricamente.

La resina DEAE (Dietilaminoetil) tiene carga positiva a pH inferiores a 7.4, indicando que moléculas cargadas positivamente no serán retenidas en la columna, mientras que las que se encuentren cargadas negativamente en este mismo rango de pH y sean retenidas en el soporte, podrán ser eluidas aumentando la fuerza iónica del eluyente.

Para obtener extractos más limpios y traslúcidos se siguió la metodología planteada por Rojas (2004), realizando una cromatografía sobre DEAE-Sephadex para los extractos crudos tratados y no tratados con Pectinex® (Figura 5-5). Se realizó un gradiente discontinuo de fuerza iónica y se obtuvieron dos fracciones (fracción no retenida y fracción retenida); la actividad aglutinante se encontró en ambas fracciones (Tabla 5-2). Lo anterior indica que hay dos proteínas con características moleculares diferentes, que se pueden separar por punto isoeléctrico. En consecuencia de aquí en adelante se hará referencia a lectina I (LLb-I) y lectina II (LLb-II).

Figura 5-5: Perfil cromatográfico de intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex para el extracto proteico de *Lepechinia bullata*.



Para la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) fue reportado un punto isoeléctrico de 8.5 (Rojas, 2004); por lo cual a pH 7.2 - 7.4 está cargada positivamente y por lo tanto no se retiene en el soporte de intercambio iónico; mientras que la LLb-II probablemente tiene un punto isoeléctrico ácido y debe estar cargada negativamente para ser retenida y eluida mediante incremento de la fuerza iónica del buffer. Con este proceso cromatográfico fue posible aislar por lo menos dos lectinas diferentes. Un comportamiento similar se había

encontrado en *Salvia bogotensis* (Torres, 2010), sin embargo la LSBo-II no se aisló ni se caracterizó.

La LLb-I (presente en la fracción no retenida) aglutinó eritrocitos Tn (Tabla 5-2, Tabla 5-3, Figura 5-6), tal como se había reportado en estudios previos (Sanabria, 1999; Rojas, 2004; Pérez y Vega, 2007). Esta fracción también mostró aglutinación sobre eritrocitos de conejo sin tratar y tratados enzimáticamente con tripsina y papaína.

El tratamiento enzimático de eritrocitos de conejo permite que haya una mejor disponibilidad de los determinantes antigénicos de la membrana, para ser reconocidos por las lectinas (comunicación personal Dr. Soorej Basheer, CERMAV-Francia), lo que indica que se requiere una menor cantidad de proteína para observar la aglutinación de eritrocitos con doble tratamiento enzimático. Estas células son un modelo sensible y práctico para determinar actividad de las lectinas, sin embargo, la hemólisis de los eritrocitos fue un comportamiento frecuente en los ensayos realizados. La fracción II mostró una actividad apreciable con los eritrocitos T y Tn, con lo que pudiera sugerirse afinidad sobre estos antígenos.

Por su parte, LLb-II (presente en la fracción retenida) presentó actividad aglutinante sobre eritrocitos A, B, O, T y Tn, observándose una mejor aglutinación con eritrocitos T, donde con 0.4 µg de esta fracción se obtuvo la máxima aglutinación.

Tabla 5-2: Actividad aglutinante sobre eritrocitos humanos de las fracciones obtenidas por intercambio iónico.

Fracción obtenida en DEAE	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (µL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (µg)	Ensayo de aglutinación con eritrocitos humanos				
				A	B	O	T	Tn
No retenida	2.6	10	26	-	-	-	-	+3
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				-	-	-	-	6.5
Retenida	0.35	10	3.5	+2	+2	+2	+4	+3
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				1.7	1.7	1.7	0.4	0.9

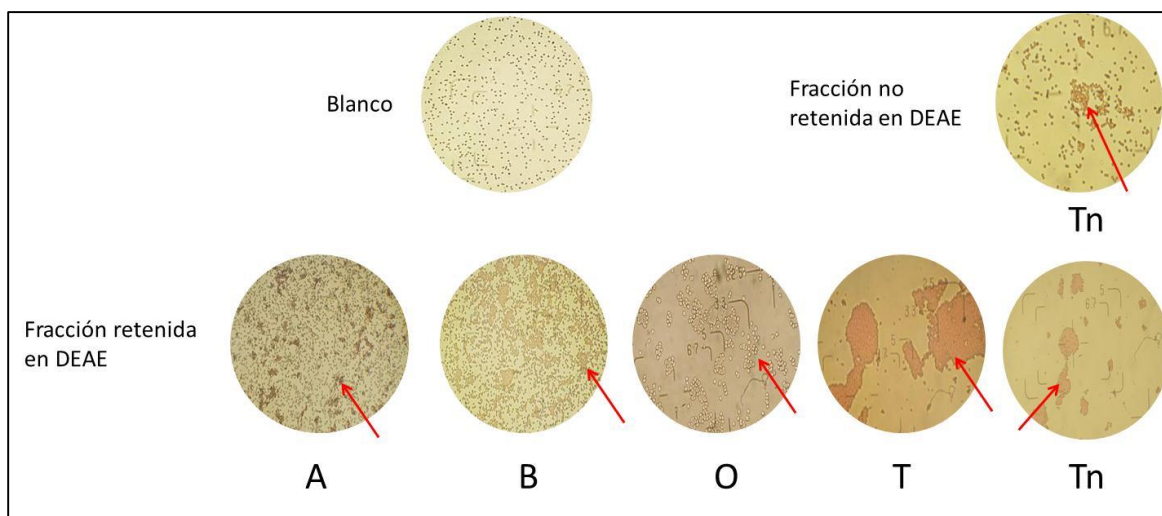
Escala : -: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte, +4: Aglutinación completa.

Tabla 5-3: Actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo de las fracciones obtenidas por intercambio iónico.

Fracción obtenida en DEAE	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (μ L)	Ensayo de aglutinación con eritrocitos de conejo			
			ST	T	P	T/P
No retenida	0.26	12.5	+	+	+	+
Mínima cantidad (μ g) de proteína con la que se observó aglutinación			3.2	3.2	1.6	0.4
Retenida	0.42	12.5	+	+	+	+
Mínima cantidad (μ g) de proteína con la que se observó aglutinación			5.2	5.2	5.2	2.6

ST: Sin tratar, T: Tratados con tripsina, P: Tratados con papaína, TP: Tratados simultáneamente con tripsina y papaína.

Figura 5-6: Eritroaglutinación de fracciones obtenidas por intercambio aniónico a partir de extractos proteicos de *Lepechinia bullata*.



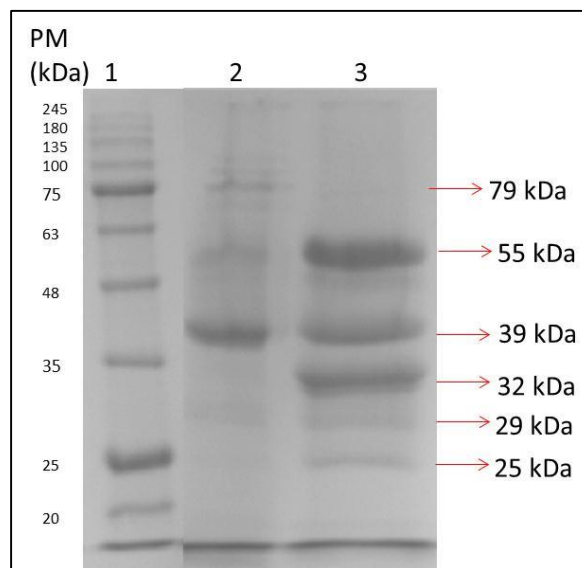
Ensayo de actividad aglutinante observado al microscopio con un objetivo 10X. Realizado con eritrocitos humanos del sistema ABO y con eritrocitos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo.

La presencia de dos o más lectinas no es un rasgo característico de una familia botánica o especie en particular; en diferentes géneros de la familia Leguminosae: *Canavalia*, *Dioclea*, *Cymbosema*, *Camptosema* y *Galactia* también se presentan dos lectinas con diferente reconocimiento por carbohidratos (Pérez, 1990; Pérez, 1998; Sierra, 1999; Melgarejo, 2005; Rocha, 2009; Batista et al., 2010; Quintero, 2014), así como en las

especies *Ulex europaeus* y *Vicia villosa* (Van Damme et al. 1998). También se ha reportado presencia de más de una lectina en especies de las familias *Moraceae*, *Gramineae*, *Liliaceae*, *Euphorbiaceae* y *Caprifoliaceae*, entre otras (Sharon y Lis, 2003). Por su parte, Nagano en 2007, hizo una revisión detallada en algas marinas en las que se ha encontrado más de una lectina en la misma especie.

Por SDS-PAGE (Figura 5-7), para la fracción no retenida se observaron bandas alrededor de los 30, 55 y 79 kDa, y una banda fuerte en aproximadamente 39 kDa. De otro lado, la fracción retenida mostró tres bandas en 32, 39 y 55 kDa aproximadamente, observadas en mayor proporción con respecto a las demás bandas presentadas alrededor de 25, 29 y 50 kDa. En general, el patrón de bandas fue diferente, evidenciando la importancia de realizar cromatografía de intercambio iónico como un primer paso en el proceso de purificación de las lectinas de *Lepechinia bullata*.

Figura 5-7: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico para *Lepechinia bullata*.

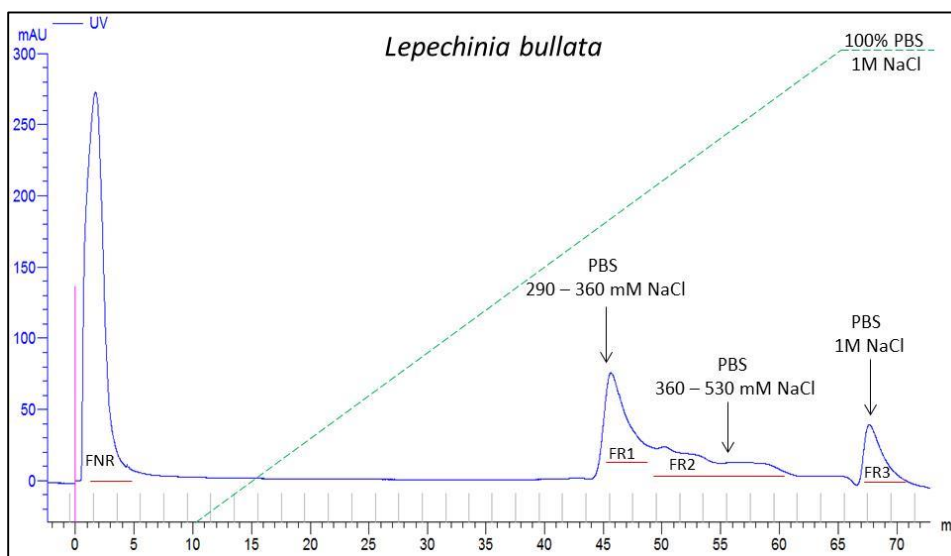


SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 130 µg de la Fracción no retenida en intercambio aniónico; carril 3. 17.5 µg de la Fracción retenida en intercambio aniónico.

Se realizaron otros ensayos de cromatografía de intercambio aniónico utilizando el sistema FPLC con gradiente de NaCl, con el cual se obtuvieron varias fracciones a las que se les

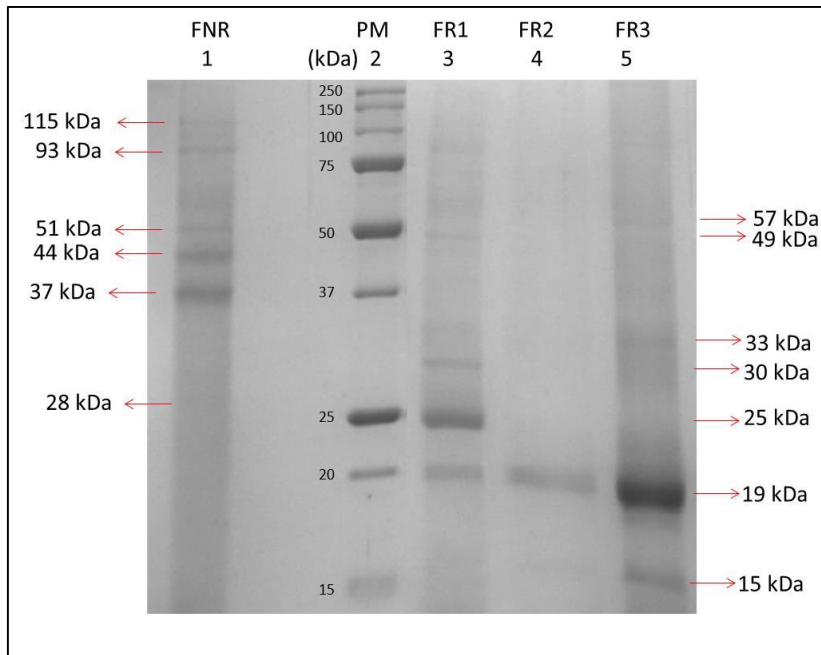
determinó su actividad aglutinante y se evaluaron por electroforesis. En la figura 5-8 se observa el perfil obtenido a 280 nm. Una vez eluida la fracción no retenida con PBS 1X, empezó a generarse un gradiente de NaCl con el cual se separaron tres fracciones retenidas (FR) a medida que aparecían picos de absorbancia en el cromatograma. El pico 1 (FR1) se eluyó con una concentración de 290 a 360 mM de NaCl; el pico 2 (FR2), aunque no fue definido, se obtuvo con una concentración de NaCl entre 360 y 530 mM; finalmente, el tercer pico (FR3) se obtuvo con 1 M de NaCl.

Figura 5-8: Perfil cromatográfico de intercambio aniónico para el extracto proteico de *Lepechinia bullata*.



La fracción no retenida presentó un patrón de bandas bien definidas en 37 y 44 kDa, y algunas tenues cercanas a 28, 51, 93 y 115 kDa (Figura 5-9). La FR1 presentó tres bandas principales en 20, 25 y 30 kDa, y un barrido de bandas de alto peso molecular (por encima de los 50 kDa); esta fracción fue la única que aglutinó eritrocitos de conejo al 4% con 11.5 µg de proteína total o en una concentración final de 0.23 µg/µL. Por otra parte, la FR2 mostró una banda cercana a los 20 kDa, mientras que en FR3 se observó un barrido de bandas por encima de 25 kDa, una banda en 15 kDa y otra muy fuerte en 19 kDa. Estas dos últimas fracciones no aglutinaron los eritrocitos de conejo.

Figura 5-9: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico para *Lepechinia bullata*, mediante FPLC.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. 25 µg de la Fracción no retenida en intercambio aniónico; carril 2. Patrones de peso molecular; carril 3. 10 µg de la Fracción retenida 1; carril 4. 10 µg de la Fracción retenida 2; carril 3. 10 µg de la Fracción retenida 3 obtenidas en intercambio aniónico utilizando FPLC.

Estos resultados corroboran la presencia de una lectina (LLb-II) en la fracción retenida y eluida por un gradiente con NaCl a una concentración entre 290-360 mM con cromatografía de intercambio iónico para la especie *Lepechinia bullata*, la cual debe tener un punto isoeléctrico inferior a 7.4; los resultados fueron similares a los obtenidos empleando un gradiente discontinuo.

▪ **Cromatografía de afinidad sobre aMSB-Sepharose 4B para obtener la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I), con reconocimiento por el antígeno Tn**

Para llevar a cabo este paso de purificación se realizaron cuatro protocolos diferentes para acoplar la asialo mucina submaxilar bovina (aMSB) a la sepharosa 4B. En la tabla 5-4 se presentan los resultados obtenidos de cada uno de los soportes sintetizados.

Cuando la unión de la aMSB a la sepharose 4B se realizó por los grupos amino de las lisinas se obtuvo porcentajes de acople alrededor del 57% con una concentración de 3.1

mg/mL de ligando; por el contrario, cuando el acople se hizo por los aminoácidos ácidos, la concentración de proteína acoplada fue aproximadamente cinco veces menor (0.69 mg/mL). La activación con bromuro de cianógeno produjo porcentajes de acople menores y una concentración de proteína unida de 1.34 mg/mL.

Tabla 5-4: Porcentajes de acople de aMSB a Sepharose 4B.

Protocolo	Porcentaje de acople (%)	mg de aMSB/mL de Sepharose 4B
<i>Sepharose 4B preactivada con bromuro de cianógenoTM (CNBr)</i>	31.0	1.34
<i>ECH-SepharoseTM 4B, método de la carbodiimida</i>	53.4	0.69
<i>SepharoseTM 4 Fast Flow preactivada con N-hidroxisuccinimida (NHS)</i>	57.1	3.12
<i>Sepharose® 4B, método de aminación reductiva</i>	58.2	3.18

Una vez empacadas las columnas, se corrió un blanco (PBS para iniciar y TRIS-OH 11.4 al finalizar) verificando así que no hubiera desprendimiento de la proteína aMSB acoplada durante la cromatografía. Para ninguno de los soportes ensayados se observó pérdida de proteína en las condiciones de corrida.

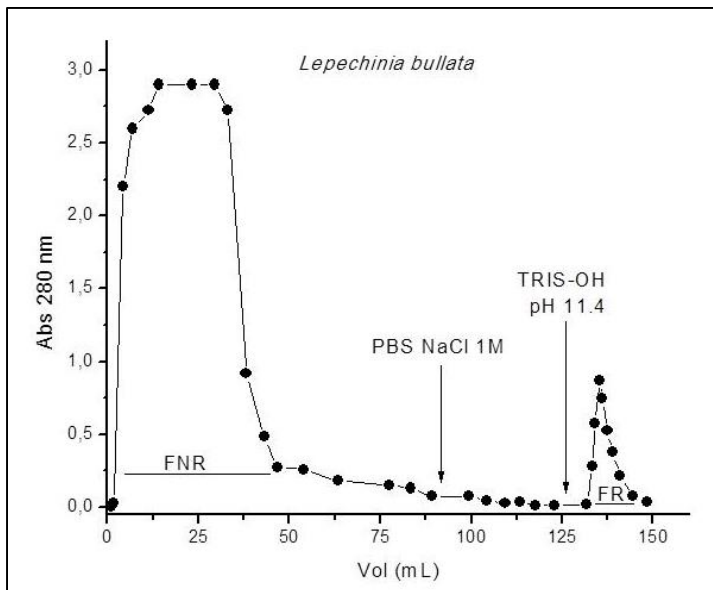
En columnas de vidrio se empacó 1.0 mL de cada uno de los soportes sintetizados y se sembraron 10 mg de proteína proveniente de la fracción no retenida de DEAE. Con el soporte que fue activado con carbodiimida no se obtuvo ninguna retención, lo que indica que probablemente la aMSB unida no presenta los determinantes Tn expuestos para el reconocimiento de la lectina. De otro lado, con los soportes obtenidos por los métodos de aminación reductiva y de Sepharose 4B preactivada con N-hidroxisuccinimida, la concentración de LLb-I obtenida fue de aproximadamente 0.02 mg/mL. Finalmente, con la sepharose 4B preactivada con bromuro de cianógeno se obtuvieron 0.05 mg/mL de LLb-I.

El soporte que presentó una mejor capacidad de retención de la lectina fue el preactivado con CNBr, con un porcentaje de acoplamiento del 31%, valor más bajo que otros métodos. Este efecto podría deberse a que la menor cantidad de ligando unida a este soporte permitió mejor interacción de la aMSB con la lectina, dejando mayor número de sitios

accesibles para el reconocimiento. De acuerdo con estos resultados, se empleó para los pasos de purificación por cromatografía de afinidad el soporte activado con bromuro de cianógeno.

La cromatografía de afinidad se realizó con la fracción no retenida obtenida por intercambio iónico sobre DEAE. La nueva “fracción no retenida” se eluyó con PBS 1X, posteriormente se pasó una solución de PBS NaCl 1 M para retirar uniones inespecíficas, y finalmente la “fracción retenida” se obtuvo mediante un cambio drástico de pH con una solución de Tris-OH pH 11.4. (Figura 5-10). Los mejores resultados fueron obtenidos cuando la muestra previamente había sido pasada por intercambio iónico; en los casos en los que se sembró directamente el extracto crudo se presentaron fracciones retenidas muy pigmentadas, además de que el soporte se bloqueó irreversiblemente.

Figura 5-10: Perfil cromatográfico de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B, para *Lepechinia bullata*.

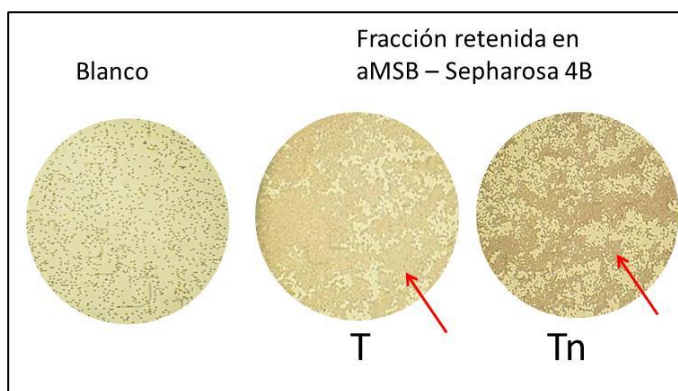


Se observó una fracción no retenida considerablemente mayor que la fracción retenida, la cual contenía la lectina con afinidad por el antígeno Tn; esta última fue concentrada y equilibrada en PBS 1X para evaluar su actividad eritroaglutinante. Los resultados se muestran en la tabla 5-5 y figura 5-11. A pesar de las condiciones de elución tan drásticas se evidenció buena actividad aglutinante únicamente sobre eritrocitos T y Tn, con una cantidad mínima de lectina pura de 0.7 µg.

Tabla 5-5: Actividad eritroaglutinante de LLb-I.

Fracción	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (µL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (µg)	Ensayo de Eritroaglutinación				
				A	B	O	T	Tn
"Retenida" Eluida con pH 11.4	0.58	5	2.9	-	-	-	+3	+3
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				-	-	-	0.7	0.7

-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte.

Figura 5-11: Eritroaglutinación de LLb-I.

Ensayo de actividad aglutinante observado al microscopio con un objetivo 10X. Realizado con eritrocitos humanos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo.

Trabajos previos reportaron que LLb-I reconocía solamente el antígeno Tn (Sanabria, 1999; Rojas, 2004); sin embargo en este estudio se evidenció que también reconoce el determinante T y que presenta aglutinación sobre eritrocitos de conejo. Estas últimas células exponen diferentes epítopes conformados por residuos galactósidos, entre ellos un tipo de glicolípido decaacárido ramificado con terminaciones de galactosa (Galili et al., 1999) (Figura 4-2, capítulo anterior).

En vegetales se ha reportado gran número de especies de diferentes familias taxonómicas que reconocen los determinantes antigénicos T/Tn, entre ellas: en la familia *Amaranthaceae* la lectina de *Amaranthus leucocarpus* pertenece al grupo de lectinas tipo amaranto (Zenteno et al., 1992); en la familia *Moraceae* las lectinas de *Artocarpus lakoocha* (ALA)

(Singh et al., 2005) y de *Morus nigra* (Morniga-G) (Wang et al., 2003) pertenecen al grupo de lectinas tipo jacalina, y en la familia Lamiaceae la lectina de *Glechoma hederacea* (Gleheda) (Van Damme et al., 2002), la cual pertenece a las lectinas tipo Leguminosa.

Previo análisis por glycoarrays (Vega et al., datos no publicados) mostró que tanto LLb-I como LSBo-I reconocieron mucinas con alta densidad del antígeno Tn pero no el monosacárido GalNAc; LLb-I también reconoció asialo mucina submaxilar bovina (aMSB) y asialo glicoforina, debido a la exposición de GalNAc; lo mismo ocurrió con agalacto glicoproteínas como la fetuína, cuando el determinante Gal β 1-4GlcNAc y residuos de α -Gal-Poliacrilamida fueron expuestos. Las preferencias de unión fueron observadas con los disacáridos GalNAc β 1-3GalNAc (di-GalNAc) y con GalNAc β 1-4GlcNAc (LDN). Con una baja extensión reconoció el trisacárido Fuc1-2Gal β 1-4GlcNAc (antígeno H-Tipo 2). Este último patrón de unión fue diferente al observado para LSBo-I, ya que no interactuó con α -Gal ni con el antígeno H-Tipo 2. También se observó reconocimiento por residuos de manosa en glicoproteínas como invertasa.

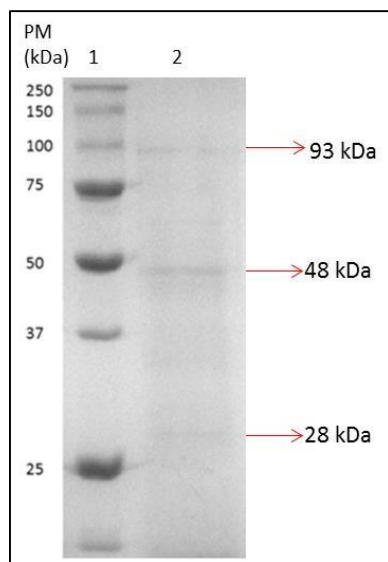
Para esta lectina previamente fue reportada la presencia de cuatro cisteínas en su estructura primaria (Sanabria, 1999) y los estudios realizados por Quintero (2006) utilizando electroforesis preparativa, permitieron determinar algunos rasgos estructurales importantes. En condiciones nativas se obtuvieron dos fracciones principales que correspondieron al monómero y al dímero, y se propuso que el dímero podría ser la forma más estable para la LLb-I; por electroforesis en el sistema Tricina-tris se observó el monómero en 26 kDa, como la banda predominante.

En este trabajo utilizando condiciones reductoras se observó una fracción predominante de alto peso molecular, lo que permite sugerir que se presentó una recombinación de subunidades mediante puentes disulfuro que generan un agregado de gran tamaño. En las figura 5-12 y 5-13 se observa el comportamiento por SDS-PAGE de LLb-I en condiciones denaturantes y reductoras. Se muestra una banda alrededor de los 93 kDa, otra en 48 kDa aproximadamente y una muy cercana a los 28 kDa; lo que sugiere la existencia de un equilibrio entre el monómero y probablemente el dímero. A pesar de someter la muestra a calentamiento exhaustivo y a la adición de DTT hasta una concentración 2 M, no fue posible reducir el agregado para obtener una única especie y por

consiguiente la presencia de una banda que en un mayor porcentaje correspondiera al monómero de la lectina.

Los resultados corroboran la ausencia de puentes disulfuro intercatenarios y sugieren que las cisteínas reportadas están formando puentes intracatenarios, sin embargo en SDS-PAGE predomina junto con las formas diméricas un agregado de alto peso molecular y/o posiblemente la forma tetramérica de LLb-I.

Figura 5-12: SDS-PAGE de LLb-I obtenida por cromatografía de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B.

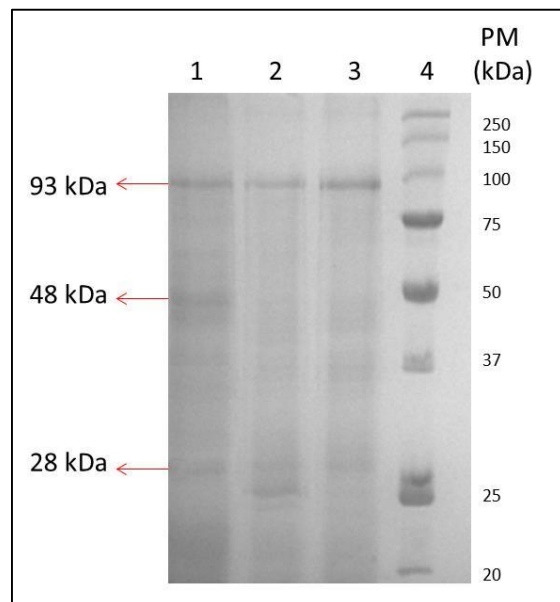


SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 30 µg de LLb-I obtenida por cromatografía de afinidad

Luego de la elución en condiciones básicas, esta fracción conservó su actividad aglutinante sobre eritrocitos de conejo, con un título apreciable de 14 µg/mL. Un comportamiento similar fue reportado por Vega y Pérez (2006) para la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I), en donde una banda de aproximadamente 72 kDa fue resistente incluso a condiciones drásticas de reducción (DTT 2 M, 100°C por 30 minutos) sugiriendo que el pH básico utilizado para eluir la lectina genera la reducción de enlaces disulfuro intracatenarios, promoviendo la formación de agregados de alto peso molecular; este comportamiento fue documentado por los grupos de Ryle y Sanger (1955a, 1955b) al realizar un análisis sobre la estructura de la insulina, y de Spackman (1960) en la ribonucleasa. En β-globulina

también se ha reportado la formación de agregados proteicos por intercambio de enlaces disulfuro para la estabilización de la estructura mediante interacciones hidrofóbicas con el SDS (Havea et al., 2004; Considine et al., 2005).

Figura 5-13: SDS-PAGE de LLb-I, sometida a diferentes condiciones reductoras.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. En cada carril se sembraron 23 μg de la proteína obtenida por cromatografía de afinidad y se sometió la muestra a diferentes condiciones reductoras. Carril 1. DTT 2 M y calentamiento a 100°C durante 15 minutos; carril 2. DTT 2 M sin calentamiento; carril 3. Calentamiento a 100°C durante 15 minutos, sin adicionar DTT; carril 4. Patrones de peso molecular.

Un ejemplo sobre la forma como interactúan las subunidades en una lectina de Lamiácea es la aislada de *Moluccella laevis*. La proteína es un tetrámero con un peso molecular de 130 kDa y por SDS-PAGE se observó que sus subunidades no están unidas covalentemente (67, 42 y 26 kDa); sin embargo al purificar la banda de 67 kDa y analizarla en condiciones reductoras se presentaron dos bandas (46 y 28 kDa), lo que significa que las dos cadenas de esta subunidad están unidas por un puente disulfuro (Lis et al, 1988); sin embargo, la única subunidad que tiene actividad es la especie de 26 kDa, que reconoce eritrocitos A (50-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y N (25-12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Duk et al., 1992).

Tomando como base las propiedades moleculares de *Glechoma hederacea*, podría sugerirse que la LLb-I tiene un comportamiento similar al reportado para ésta con respecto

al peso molecular de sus subunidades (28 kDa), aunque en Gleheda están unidas por puentes disulfuro intercatenarios y se asocia en forma tetramérica preferentemente (Van Damme et al., 2002; Wang et al 2003b). Esta lectina es específica hacia residuos de GalNAc y aglutina mejor los eritrocitos de conejo tripsinizados que los del grupo A, lo mismo sucede con LLb-I.

La Gleheda y la LLb-I son glicoproteínas; la LLb-I tiene 14.1% de carbohidratos, el cual fue determinado realizando ensayos de deglicosilación con PNGase (Sanabria, 1999). Los oligosacáridos que se presentan en glicoproteínas de origen vegetal por lo general son conservados, por lo tanto es posible que el glicano presente en LLb-I sea similar al encontrado en las lectinas de *Salvia sclarea* (LSS), Gleheda y LSBo-I ; constituido de 6 a 8 unidades de monosacárido con un “core de manosas” (Pérez y Vega, 2007).

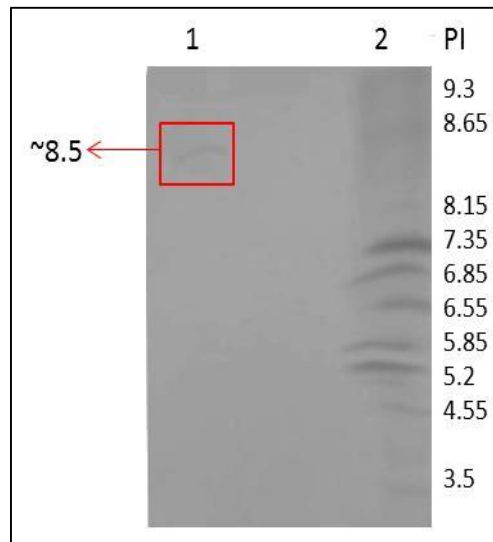
En cuanto a la composición de aminoácidos, previamente se reportó un alto contenido de glicina, lisina, histidina, serina y treonina. Los cuatro residuos de cisteína están formando dos puentes disulfuro intracatenarios de forma similar a la LSBo-I. Los resultados y los reportes previos permiten sugerir que LLb-I se asocia en forma dimerica y tetramérica por medio de interacciones no covalentes (Sanabria, 1999; Pérez y Vega, 2007).

Otros estudios utilizando anti-LSBo-IgY mostraron que el anticuerpo policlonal reconoce LLb-I (Vega et al, 2009), por lo tanto LSBo-I y LLb-I pueden tener secuencias lineales y conformacionales similares. La determinación de la secuencia N-terminal no arrojó resultados satisfactorios por la cantidad y calidad de las bandas que fueron secuenciadas. A pesar de llevar a cabo varias transferencias no se logró obtener una cantidad suficiente de lectina para la degradación de Edman (Anexo G).

La determinación del punto isoeléctrico mostró una banda alrededor de 8.5 (Figura 5-14), similar al reportado para otras lectinas de Lamiáceas como la LSS, en la que se observaron dos bandas, 8.0 y 8.8 (Piller et al., 1986), y LSBo-I, para la cual se encontró un pI entre 8.6 y 8.8 (Vega y Pérez, 2006). Dado que la solubilidad de la proteína en PBS 1X fue de máximo 1.0 mg/mL, en este estudio no se logró obtener un comportamiento electroforético con bandas de buena calidad que permitieran realizar estudios de caracterización bioquímica y secuenciación. Sin embargo la solubilidad fue mayor a la descrita previamente (0.5 mg/mL) (Rojas, 2004).

Figura 5-14: Isoelectroenfoque de LLb-I.

82 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*



PAGE 10%. Carril 1. 30 µg de la lectina; carril 2. Patrones de corrida para Punto isoeléctrico.

Con el fin de buscar otra estrategia de purificación de LLb-I, se utilizó el soporte GalNAc-Sepharose 4B sintetizado en el GRIP, después de haber sido probado con un blanco de corrida (Anexo H).

Previamente, a una alícuota de 0.5 mL de soporte se le realizó un control de corrida y un ensayo de funcionalidad sembrando 0.6 mg (300 µL de solución 2.0 mg/mL) de la lectina de *Galactia lindenii* (LGL-II), la cual reconoce lactosa y el determinante H2 pero su actividad se ve inhibida por GalNAc (Almanza, 2004). La elución se realizó con lactosa 0.2 M y posteriormente con glicina 50 mM pH 3.0 para romper las posibles interacciones lectina – ligando y eluir la totalidad de la proteína.

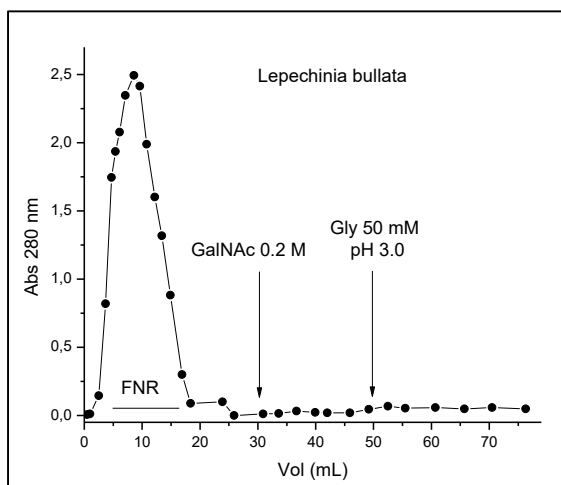
El perfil cromatográfico a 280 nm mostró picos similares para las fracciones retenida y no retenida, obteniendo finalmente 200 µg de LGL-II eluida con lactosa 0.2 M (Anexo H). Debido a que se evidenció un soporte funcional, se utilizó esta columna para intentar la purificación de LLb-I.

Se sembraron 10 mg de la fracción no retenida obtenida por cromatografía de intercambio iónico de *lepechinia bullata*. La fracción no retenida se obtuvo con el buffer de equilibrio (PBS 1X) y para la elución de la lectina se utilizó GalNAc 0.2 M / PBS 1X, pero ningún pico de absorbancia a 280 nm fue observado. Con el fin de recuperar cualquier especie proteica

unida a la columna, se hizo una elución con glicina 50 mM pH 3.0, sin embargo, tampoco se obtuvo ninguna fracción.

El perfil cromatográfico se realizó colectando volúmenes de aproximadamente 500 μ L y midiendo absorbancia a 280 nm (Figura 5-15).

Figura 5-15: Perfil cromatográfico de afinidad sobre GalNAc–Sepharose 4B, para *Lepechinia bullata*.



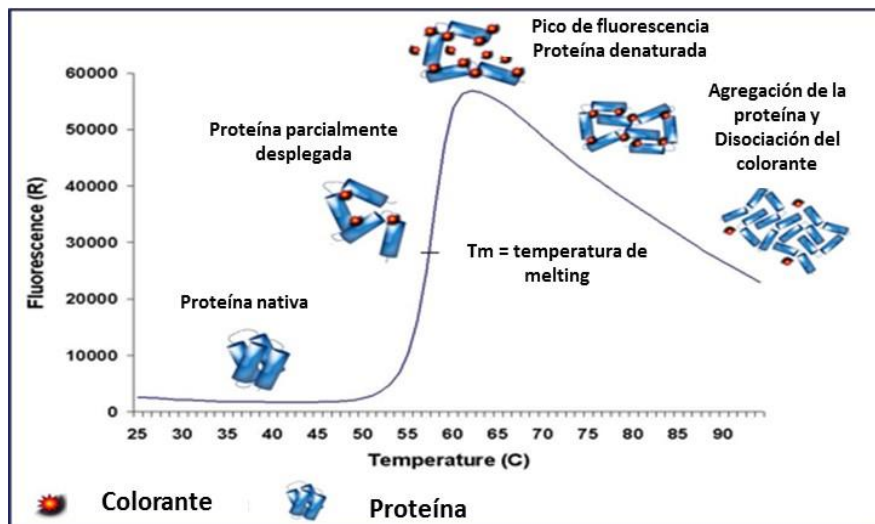
Como se observa en el cromatograma, no fue posible purificar LLb-I mediante este soporte, esto puede obedecer a que la lectina no interactuó con el ligando ya que ésta tiene mayor afinidad por estructuras ricas en antígeno Tn, pero no sobre el monosacárido GalNAc.

5.1.2 Determinación de la estabilidad térmica de LLb-I mediante TSA

En la siguiente gráfica se muestra una curva típica del estabilidad térmica para proteínas, en la que se contemplan las fases de unión del colorante a la lectina, emisión de fluorescencia y agregación de la proteína.

Figura 5-16: Comportamiento típico de una proteína sometida al ensayo TSA.

84 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*



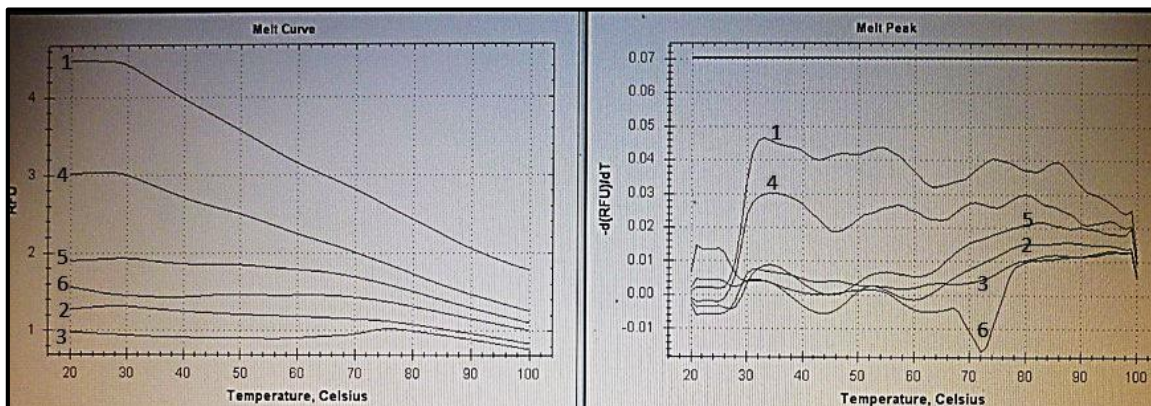
Tomada y modificada de: http://www.wikiwand.com/en/Thermal_shift_assay

A pesar de que el ensayo se corrió con tres concentraciones diferentes de LLb-I en PBS 1X (0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL), ninguna de las muestras permitió observar la Tm como un indicativo de la temperatura en la que la lectina se desnaturaliza. La concentración máxima a la que se realizó este ensayo fue de 0.5 mg/mL con el fin de garantizar la solubilización completa de la muestra. Su solubilidad es de 1.0 mg/mL.

Como se observa en la figura 5-17, desde el inicio del ensayo (donde la temperatura está más baja) hasta el final del mismo a 100°C, no se observó un pico de emisión de fluorescencia producto de la unión del colorante SYPRO® orange a los residuos hidrofóbicos de la proteína (Semisotnov, 1991).

Este comportamiento sugiere que independientemente de la concentración, el incremento de temperatura no fue una condición suficiente para lograr la denaturación de LLb-I, y adicionalmente la proteína presentó un estado de “agregación” que impidió la unión del fluoróforo a los aminoácidos hidrofóbicos.

Figura 5-17: Resultados de termoestabilidad mediante TSA para LLb-I.



En el cuadro de la izquierda se observa la curva de melting y en el de la derecha el pico de melting. Resultados obtenidos a partir de dos muestras diferentes de LLb-I en PBS 1X en concentraciones de 0.5 mg/mL (muestras 1 y 4), 0.2 mg/mL (muestras 2 y 5), 0.1 mg/mL (muestras 3 y 6).

En proteínas hidrofóbicas ocurre un caso contrario al observado en estos resultados, y es que desde el inicio del ensayo se dan valores muy altos de fluorescencia, por lo tanto tampoco es posible un cálculo de la T_m ya que el colorante se une a los aminoácidos hidrofóbicos sin necesidad de desplegar la proteína.

El resultado obtenido con este ensayo estaría en concordancia con las bandas de LLb-I de 93 kDa observadas en electroforesis, las cuales mostraron un agregado que no fue posible disociar a pesar de ser sometido a condiciones drásticas de reducción (2 M DTT y 100°C durante 15 minutos); sin embargo es de resaltar que a pesar de mantenerse en estado agregado, LLb-I es una lectina funcional que mantuvo actividad eritroaglutinante.

Ensayos de estabilidad térmica realizados en trabajos anteriores (Rojas, 2004), mostraron que la lectina se ve fácilmente inactivada por la temperatura, la actividad aglutinante se observó hasta 50°C, y a esa temperatura los títulos de aglutinación disminuyeron en comparación con la actividad eritroaglutinante a temperatura ambiente; además a temperaturas superiores a 80°C la lectina precipita por denaturación; para LSBo-I y Gleheda la estabilidad se mantiene hasta 65°C (Pérez y Vega, 2007).

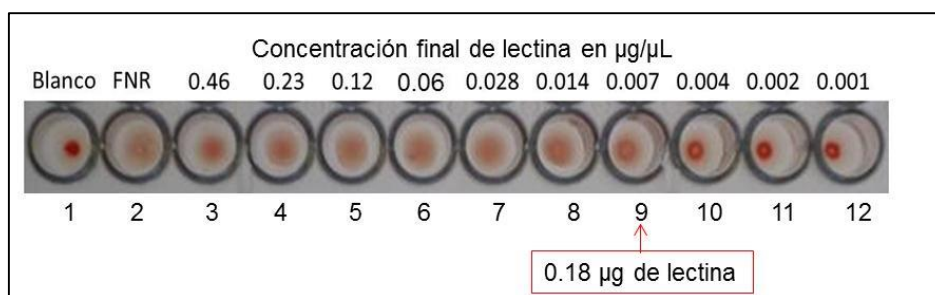
De acuerdo con los resultados anteriores, es posible sugerir que las condiciones básicas de elución de la LLb-I durante la cromatografía de afinidad, promueven la formación de agregados que llevan a la obtención de un porcentaje de lectina agregada promovido por el pH básico, pero que conserva parcialmente su actividad eritroaglutinante.

5.1.3 Título de eritroaglutinación para LLb-I

La determinación de la concentración mínima de lectina necesaria para observar eritroaglutinación se realizó mediante diluciones seriadas de la proteína, utilizando 12.5 μL de solución de eritrocitos de conejo en PBS y 12.5 μL de muestra. La figura 5-18 muestra el ensayo de eritroaglutinación de esta lectina partiendo de una muestra de concentración 0.92 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

La LLb-I presentó una concentración mínima de aglutinación de 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que corresponde aproximadamente a 0.18 μg totales de proteína pura para observar aglutinados pequeños por microscopía de luz. Esta concentración es mayor que la reportada previamente para las lectinas de Lamiáceas con reconocimiento por el antígeno Tn obtenidas a partir de *Salvia bogotensis* (0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Vega y Pérez, 2006) y de *Glechoma hederacea* (0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Wang et al., 2003a); sin embargo con eritrocitos tratados enzimáticamente (tripsina + papaína) la concentración podría ser comparable con la actividad de estas especies, ya que previamente se observó que el tratamiento enzimático de los glóbulos rojos de conejo, mejoraba la aglutinación por la LLb-I.

Figura 5-18: Título de aglutinación para LLb-I.



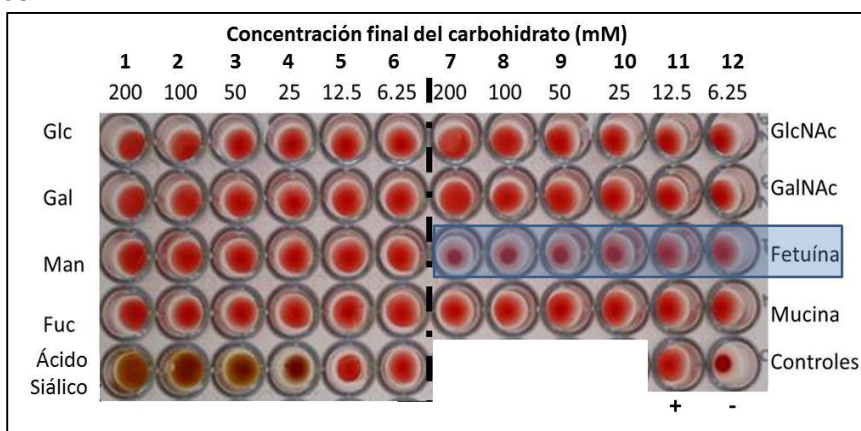
Pozo 1. Eritrocitos de conejo al 4% y PBS 1X (**Blanco**); pozo 2. Eritrocitos al 4% en contacto con la fracción no retenida en cromatografía de intercambio iónico (**control positivo**); carriles 3 - 12. Diluciones seriadas de la lectina pura, en presencia de eritrocitos de conejo al 4%.

5.1.4 Inhibición de eritroaglutinación por diferentes azúcares para LLb-I

Se ensayaron glucosa, galactosa, manosa, fucosa, ácido siálico, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fetuína de suero fetal bovino y mucina de estómago porcino, partiendo de una concentración de 200 mM del azúcar y con diluciones seriadas hasta 6.25 mM en 12.5 μ L de PBS, volumen que fue complementado con 25 μ L de eritrocitos de conejo al 4% y 12.5 μ L de lectina pura en concentración 0.5 μ g/ μ L; de esta forma se aseguró que la proteína se encontrara por encima de la concentración mínima en la que presentó actividad.

La menor concentración de carbohidrato a la cual visiblemente disminuyó la aglutinación, se tomó como concentración mínima inhibitoria (Benevides, 2012). En la figura 5-19 se observa que ninguno de los carbohidratos en las concentraciones ensayadas inhibió la actividad eritroaglutinante de la lectina a excepción de la fetuína, con la cual se vió disminuida notoriamente la aglutinación de eritrocitos de conejo con la lectina, en una concentración mínima inhibitoria de 25 mM.

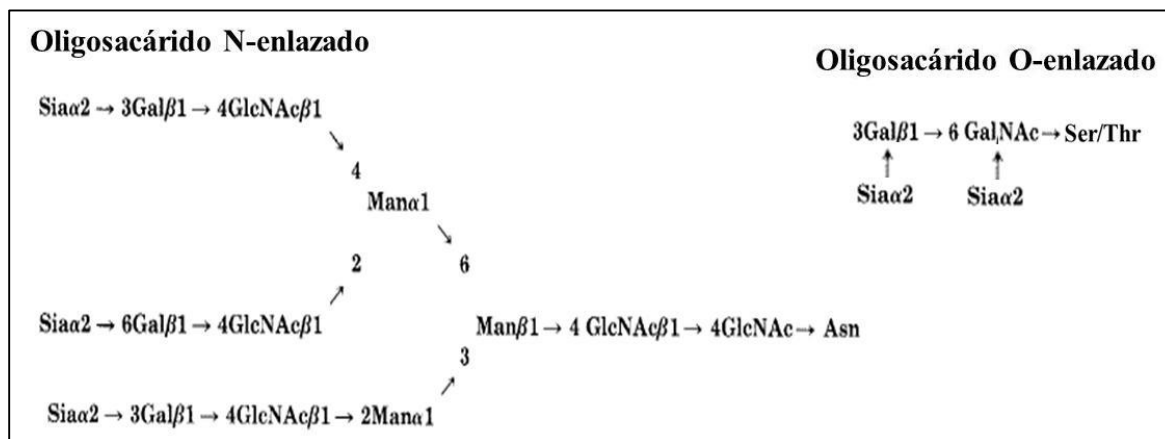
Figura 5-19: Inhibición de eritroaglutinación para LLb-I, utilizando diferentes carbohidratos.



Glc: Glucosa, Gal: Galactosa, Man: Manosa, Fuc: Fucosa, GlcNAc: N-acetilglucosamina, GalNAc: N-acetilgalactosamina. Control +: Eritrocitos y lectina, control -: Eritrocitos y PBS. Columnas 1 – 6 y 7 – 12: Diluciones seriadas de los carbohidratos mencionados en los lados de la figura (Desde 200 mM hasta 6.5 mM). En el recuadro azul se resalta el resultado con fetuína.

La fetuína es una glicoproteína que tiene estructuras N-glicosídicas y O-glicosídicas (Baenziger y Fiete, 1979) (Figura 5-20). En este último caso, el oligosacárido tiene el ácido siálico expuesto y se une al antígeno T (Gal-β1,3-GalNAc-Ser/Thr), el cual se expone totalmente si se realiza desialilación con ácidos diluidos (Terra et al., 2010).

Figura 5-20: Estructura de oligosacáridos presente en Fetuína (Baenziger y Fiete, 1979).



La inhibición de la fetuína sobre la actividad aglutinante de LLb-I pudo presentarse debido a que no todos los sitios están sialilados, y es posible encontrar en su estructura un bajo porcentaje de exposición del antígeno T; esto corrobora los resultados de aglutinación realizados con eritrocitos T y previamente reportados por Glicoarreglos (Comunicación personal, Vega N).

En 2006, Vega y Pérez reportaron el reconocimiento que presentó la LSBo-I sobre estructuras que presentaban el antígeno Tn, y la inhibición de eritroaglutinación observada con mucina submaxilar ovina (MSO) y mucina submaxilar bovina (MSB), las cuales tienen un porcentaje de GalNAc expuesto cercano a 15 y 18% respectivamente. Al someter estas glicoproteínas a desialilación, los residuos de GalNAc quedan totalmente expuestos.

La mucina de estómago porcino generó aglutinación de eritrocitos de conejo sin necesidad de adicionar la lectina, por lo tanto, su resultado como inhibidor de la eritroaglutinación de LLb-I no pudo ser analizado. Esta proteína posee O-glicanos en su núcleo, con presencia de Gal β1-3 GalNAc y terminaciones N-acetil-lactosamina, fucosa α1-2 Gal, GalNAc α1-3,

GalNAc α 1-3 [Fuc α 1-2] Gal, GlcNAc α 1-4Gal, e incluso los antígenos T y Tn (Van Halbeek et al., 1982; Zenteno et al., 1995; Karlsson et al., 1997).

Este comportamiento de aglutinación de eritrocitos puede deberse a la propiedad que tienen las mucinas de agregarse y formar asociaciones con otras moléculas generando interacciones muco-adhesivas (Bansil y Turner, 2006). Por su estructura con un alto porcentaje de carbohidratos, se ha reportado que algunas mucinas pueden unirse a receptores de membrana causando la aglutinación de microorganismos (García et al., 2012), mecanismo que podría estar dándose en este caso de aglutinación de eritrocitos de conejo no-mediado por LLb-I.

De otro lado, el ensayo con ácido siálico se dificultó debido al pH ácido que presentaba la solución de este azúcar y a la dificultad en su solubilización; sin embargo se observó que no fue un buen inhibidor. La glucosa, manosa, fucosa y N-acetilglucosamina tampoco presentaron inhibición sobre la actividad aglutinante.

La galactosa y la N-acetilgalactosamina no mostraron inhibición a las concentraciones ensayadas, lo que sugiere que para el reconocimiento de la LLb-I se necesitan otras estructuras que hacen parte del oligosacárido y en el caso del antígeno T y Tn un residuo de serina/treonina. Para otras lectinas de Lamiáceas con reconocimiento por el antígeno Tn han sido reportados estudios de inhibición de aglutinación, algunos de los cuales se resumen en la tabla 5-6.

Otros ensayos han sido enfocados en la inhibición de interacción de la LLb-I-biotinilada con líneas celulares tumorales. Los resultados mostraron que los mejores inhibidores fueron GalNAc, aMSB y MSO. La cantidad mínima requerida para observar un 50% de inhibición fue de 0.42 μ g de MSO y de 0.2 μ g de aMSB, con lo que se evidenció una mayor especificidad por el determinante Tn (Rojas, 2004).

En los estudios de interacción de las lectinas con el antígeno Tn se ha observado que la afinidad se incrementa por la presencia de una alta polivalencia del antígeno Tn sobre la superficie de las células tumorales (Robles et al., 2010; Rougé et al., 2011). Tomando como ejemplo el caso de la isolectina B₄ de *Vicia villosa* (VVLB₄), (Tollefsen y Kornfeld, 1983), se ha identificado que la formación del cluster Tn es un factor que incrementa

marcadamente su afinidad con respecto a un solo residuo. Esto ha llevado a establecer un orden decreciente en la interacción de VVLB₄ con la estructura Tn: Tn polivalente >> glicopéptidos Tn >> Tn monomérico hasta glicopéptidos tri-Tn > GalNAc >> Gal (Wu, 2004).

Tabla 5-6: Inhibición de la actividad eritroaglutinante de lectinas de Lamiáceas que reconocen el antígeno Tn.

Especie	Inhibidor	Concentración	Referencia
<i>Lepechinia bullata</i> (LLb-I)	GalNAc	75 mM	Sanabria, 1999 ¹
	aMSB	0.2 µg/µL	Rojas, 2004 ²
	aMSO	0.42 µg/µL	
	Fetuína	25 mM	Este trabajo ³
<i>Salvia bogotensis</i> (LSBo-I)	GalNAc	37.5 mM	Vega y Pérez, 2006 ⁴
	MSO	0.019 mM*	
	aMSB	0.008 mM*	
<i>Salvia sclarea</i>	GalNAc	0.1 mM	Piller et al., 1986 ⁵
	Gal	75 mM	
	aMSB	0.02 mM*	
	MSB	0.04 mM*	
<i>Moluccella laevis</i>	GalNAc	2.0 µg/mL	Alperin et al., 1992 ⁶
		0.1 µg/mL	
	aMSO	0.03 µg/mL	
<i>Glechoma hederácea</i> (Gleheda)	GalNAc	25 mM	Wang et al., 2003 ^a ⁷

GalNAc: N-acetilgalactosamina; Gal: Galactosa; MSO: Mucina submaxilar ovina; aMSO: Asialo mucina submaxilar ovina; MSB: Mucina submaxilar bovina; aMSB: Asialo mucina submaxilar bovina. * Expresado como concentración de GalNAc terminal libre

1. Realizado sobre eritrocitos humanos que exponen antígeno Tn
2. Realizado sobre líneas celulares de cáncer de seno (MCF-7) y cáncer de cérvix (HeLa).
3. Realizado sobre eritrocitos de conejo
4. Realizado sobre eritrocitos humanos que exponen antígeno Tn
5. Realizado sobre eritrocitos humanos que exponen antígeno Tn
6. Realizado con eritrocitos humanos A^{MM} y O^{NN}
7. Realizado sobre eritrocitos humanos tratados con tripsina

En 2005, Wu reportó un estudio realizado con ensayos de inhibición y ELLSA (enzyme-linked lectinosorbent), en el que confirmó el reconocimiento del antígeno Tn por la lectina de *Salvia sclarea* (LSS) y la necesidad de estructuras polivalentes del antígeno para incrementar su afinidad. Las dos estructuras que presentaron mejor reconocimiento por parte de LSS fueron la glicoproteína salival de armadillo y la asialoglicoproteína salival

ovina, las cuales exponen el antígeno Tn en alta densidad. Así mismo, las moléculas inhibitoras más potentes fueron las que presentaron Tn polivalente expuesto en su estructura.

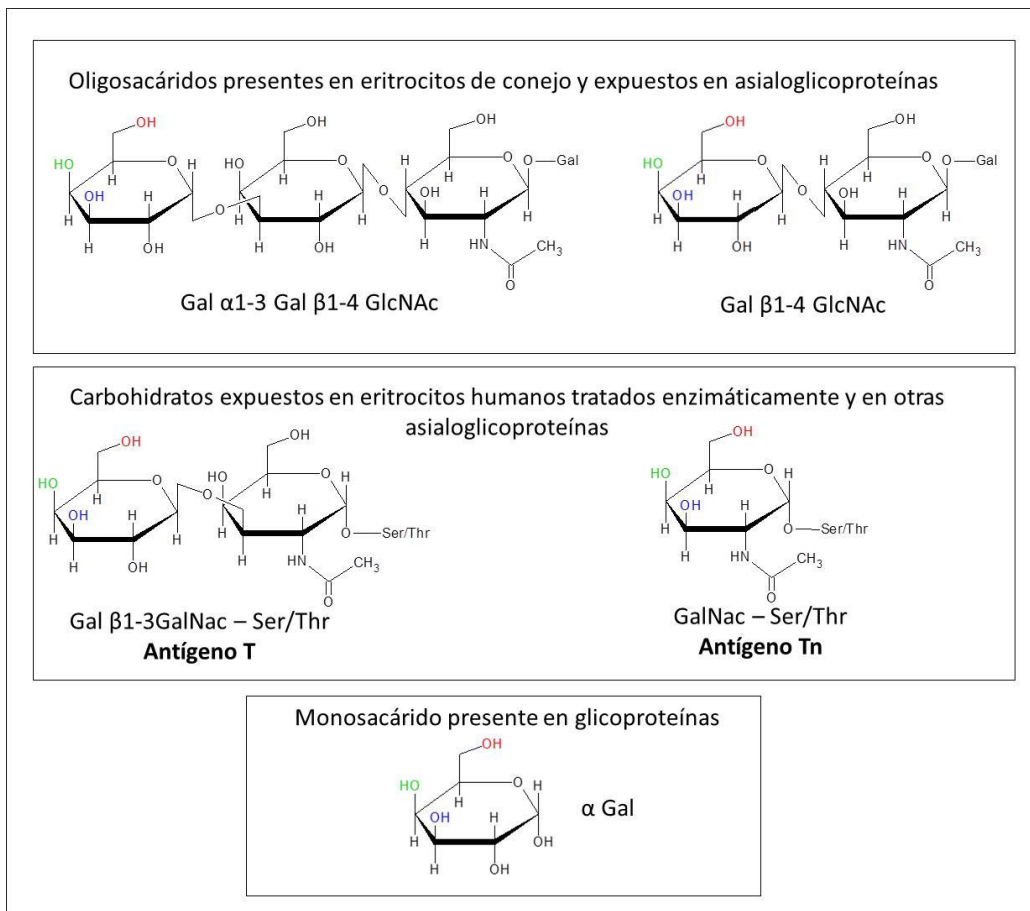
Esta característica también ha sido reportada en lectinas aisladas de hongos, como es el caso de la aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA), en la que se observó que moléculas polivalentes de Gal β -1, GalNAc α 1-Ser/Thr (antígeno Tn) y estructuras relacionadas, se enlazan más fuertemente a la lectina que las formas monoméricas de los determinantes o los propios monosacáridos. Así mismo, se estableció un orden decreciente de enlace descrito así: estructuras multivalentes de antígenos T y Tn >>>> antígenos T y Tn monoméricos >>>GalNAc >>>> Gal (inactivo) (Wu et al., 2003). Lo anterior también podría explicar la capacidad de las lectinas como LLb-I en el reconocimiento de diferentes residuos carbohidratos (T, Tn), comportamiento que estaría sujeto a determinación de las afinidades para poder establecer sus constantes y de esta forma su orden de interacción.

Para algunas lectinas de Leguminosa con afinidad por Man/Glc como Concanavalina A, lectina de *Dioclea grandiflora* y lectina de *Cymbosema roseum* también se ha reportado incremento de afinidad en la unión con estructuras que presentan altas densidades de carbohidratos, que con el monosacárido (Dam et al., 2002, 2007 y 2011).

La interacción de mono y oligosacáridos que contienen manosa se realizó mediante ensayos de inhibición y de titulación calorimétrica isotérmica (ITC), lo que llevó a sugerir que estas lectinas presentan un sitio de unión conservado que permite ubicar el core de trimanosa. Los resultados sugieren que la LLb-I reconoce preferentemente los oligosacáridos de glicolípidos y glicoproteínas que contengan GalNAc o galactosa terminal, en este caso en particular los antígenos T y Tn y algunos de los glicolípidos presentes en los eritrocitos de conejo.

Con base en los resultados obtenidos hasta ahora, en la siguiente figura (5-21) se presentan algunas de las estructuras reconocidas por LLb-I, resaltando grupos conservados en los carbohidratos terminales que podrían sugerirse como sitios importantes para el reconocimiento de la lectina.

Figura 5-21: Estructuras glicosídicas reconocidas por LLb-I.



Sobre el monosacárido del extremo se representan los grupos OH conservados en todas las estructuras. Azul, OH del carbono 3; verde, OH del carbono 4; rojo, OH del carbono 6. Gal: Galactosa; GalNac: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina, Ser: Serina, Thr: Treonina.

Como se observa, los OH de los carbonos 3, 4, y 6 de todas las estructuras tienen la misma orientación, por lo que pudiera ser un indicativo de su papel en la interacción con la lectina; de igual forma puede sugerirse que ni el tipo de enlace (1-4 o 1-3) ni la configuración anomérica (α o β) están siendo discriminados por la lectina. La presencia del grupo N-acetil en el carbono 2 del carbohidrato tampoco es un factor decisivo en el reconocimiento de LLb-I hacia el ligando.

Estos resultados concuerdan totalmente con lo encontrado por Glycoarrays (Vega et al., datos no publicados) en los que se observó el reconocimiento de asialoglicoproteínas

debido a la exposición del antígeno Tn (GalNAc – Ser/Thr), así como por disacáridos GalNAc β 1-3GalNAc y GalNAc β 1-4GlcNAc como los presentes en eritrocitos de conejo.

El mismo comportamiento de LLb-I ha sido descrito en la mayoría de lectinas de Leguminosa con especificidad por Man/Glc o Gal/GalNAc, en las que el reconocimiento se debe a los grupos OH de los carbonos 3 y 4 del ligando con aminoácidos presentes en el sitio de unión (Sharpe, 2003). En el caso de la lectina de *Vatairea macrocarpa*, las interacciones presentes en el reconocimiento del antígeno Tn incluyen los grupos OH de los carbonos 3, 4 y 6 del GalNAc (Sousa et al., 2016).

Finalmente, en la tabla 5-7 se resumen las propiedades moleculares de las lectinas de Lamiáceas reportadas hasta la fecha.

Tabla 5-7: Propiedades moleculares de lectinas con reconocimiento del antígeno Tn, encontradas en Lamiáceas.

Lectina	Reconocimiento	Peso molecular (kDa)		% Carbohidratos	Punto Isoeléctrico	Enlaces disulfuro	Referencia
		Nativa	Sub-unidades				
<i>Hyptis mutabilis</i>	Tn	N.D	55, 51	27.7	7.5 y 6.7	N.D	Piller <i>et al.</i> , 1986; Medeiros <i>et al.</i> , 2000.
<i>Glechoma hederacea</i> (Gleheda)	T, Tn	60	26, 28	10	N.D.	Intercatenario	Wang <i>et al.</i> , 2003a
<i>Salvia sclarea</i> (SSL)	Tn	50	35	15	8.8 y 8.0	Intercatenario	Piller <i>et al.</i> , 1986; Medeiros <i>et al.</i> , 2000.
<i>Salvia palifolia</i>	Tn	N.D	58, 64	23.8	7.4 y 6.8	N.D	Piller <i>et al.</i> , 1986; Medeiros <i>et al.</i> , 2000.
<i>Molucella laevis</i> (MLL)	Tn	130	26, 28, 42	10	N.D.	Intercatenario Intracatenario	Lis <i>et al.</i> 1988; Duk <i>et al.</i> , 1992; Alperin et al., 1992; Lis y Sharon 1994.
<i>Salvia bogotensis</i> (LSBo-I)	T, Tn, eritrocitos de conejo	72	38.7	16	8.6 - 8.8	Intracatenario	Vega y Pérez, 2006; este trabajo
<i>Lepechinia bullata</i> (LLb-I)	T, Tn, eritrocitos de conejo	93* /**	28*, 42*	13.4	8.5	Intracatenario	Sanabria, 1999; Rojas, 2004; Quintero, 2006; este trabajo

N.D: No determinado, * Proteína reducida, ** Proteína no reducida.

A partir de 50 g de semillas se obtuvo entre 2.6 a 3.6 mg de lectina pura. Por cada gramo de proteína total extraída se purificaron 0.5 mg de LLb-I, con un rendimiento del 0.05%. Este valor es similar al encontrado en *Salvia sclarea* (2.5 mg/50 g de semillas) (Piller et al., 1986), pero más bajo que el reportado para la lectina de *Molucella laevis* (7.5-10 mg/ 50 g de semillas) (Alperin et al., 1992), *Salvia bogotensis* (9-10 mg/50 g de semillas) (Vega y

Pérez, 2006) y Gleheda (0.5 mg/ 50 g) aunque es de resaltar que en *Glechoma hederacea* la lectina fue extraída de hojas y no de semillas (Wang et al., 2013).

5.2 Determinación de la secuencia parcial de aminoácidos de la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I), específica para el antígeno T/Tn

5.2.1 Extracción y purificación de la lectina

- **Colección de semillas de *Salvia bogotensis***

Las semillas maduras de *Salvia bogotensis* fueron colectadas en la zona de Mondoñedo (Cundinamarca). La especie fue identificada por el Dr. José Luis Fernández del Instituto de Ciencias Naturales e investigador del GRIP, y registrada con el código COL-422764 (Vega y Pérez, 2006).

Figura 5-22: Espécimen de *Salvia bogotensis*.



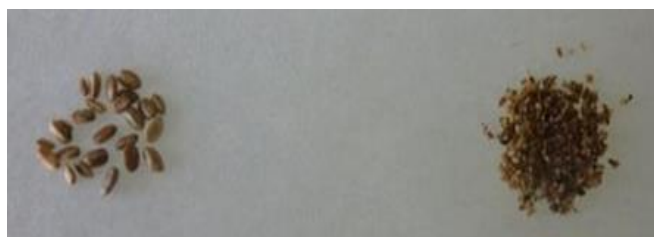
Imagen tomada de www.latin-wife.com//blog/colombia/salvia-bogotensis/

La figura 5-22 muestra un espécimen de *Salvia bogotensis* donde puede apreciarse las hojas y los ramilletes de flores característicos de estas especies. Dentro de cada una de las flores, las cuales tienen forma de labios, se encuentran las semillas.

▪ **Preparación de extractos de proteína total a partir de semillas de *Salvia bogotensis***

Las semillas colectadas presentaron un color café típico de su estado maduro y fueron trituradas con un molino hasta obtener un polvo fino para facilitar la extracción (Figura 5-23).

Figura 5-23: Semillas de *Salvia bogotensis* maduras, antes y después de ser trituradas.



Semillas sin triturar (izquierda). Semillas trituradas (Derecha).

Las soluciones obtenidas a partir de las tres extracciones se unieron en un pool y se precipitaron con etanol entre el 0-60% como fue reportado previamente por Vega y Pérez (2006). En la tabla 5-8 se presentan los resultados de los diferentes pasos de obtención del extracto, su cuantificación y actividad aglutinante..

Tabla 5-8: Cuantificación y actividad eritroaglutinante de los extractos proteicos obtenidos a partir de semillas de *Salvia bogotensis*.

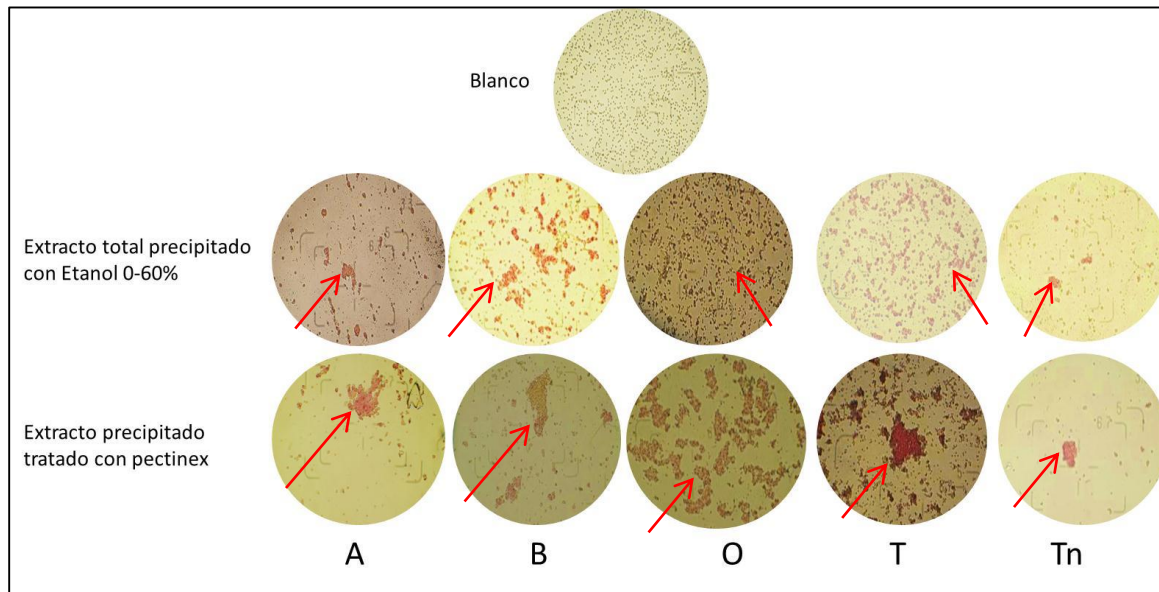
Proceso	Volumen (mL)	Concentración (mg/mL)	Cantidad total de proteína (mg)	µg aglutinación (2 µL de extracto)	Ensayo de Eritroaglutinación				
					A	B	O	T	Tn
Extracto Total	1143	5.6	6400.8	11.2	+2	+2	+1	+2	+1
Precipitado Etanol0-60% Pectinex®	700	1.03	721	2.06	+3	+3	+3	+3	+2
Cantidad total de proteína extraída a partir de 50 g de semillas de <i>Salvia bogotensis</i>			6400.8 (12.8%)						

-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte.

El precipitado fue solubilizado y tratado con Pectinex® para disminuir su alta viscosidad y continuar con la purificación de la lectina. Como se describió anteriormente, la mezcla de poligalacturonasas solamente degrada el mucílago presente en las semillas (Fernández-Alonso et al., 2003 y 2009; Vega, 2004; Pérez y Vega, 2006).

La actividad aglutinante del extracto se observó con todos los tipos de eritrocitos ensayados, sin embargo la actividad fue mayor con eritrocitos O y T (Figura 5-24; Tabla 5-8).

Figura 5-24: Eritroaglutinación del extracto proteico de semillas de *Salvia bogotensis*.



Ensayo de actividad aglutinante realizado con eritrocitos humanos del sistema ABO y con eritrocitos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo.

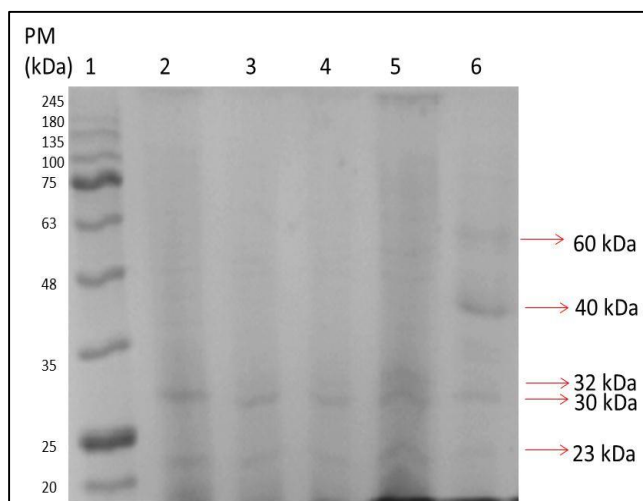
El tratamiento con pectinex mejoró la interacción de las lectinas con los determinantes antigénicos, comportamiento similar al observado con LLb-I y discutido con anterioridad (Fernández-Alonso et al., 2003 y 2009; Vega, 2004; Pérez y Vega, 2006). A partir de 50 g de semillas se obtuvieron 6.4 g de proteína total, lo cual corresponde al 12.8%, siendo similar al reporte previo de 13.1% de proteína obtenida bajo las mismas condiciones para *Salvia bogotensis* (Vega, 2004), y al obtenido para *Lepechinia bullata* en este estudio (12.5%).

Con este ensayo se confirmó una observación previa realizada por Vega y Pérez (2006), en la que se reportó que el tratamiento de extractos crudos con Pectinex® potencia la actividad eritroaglutinante de las lectinas presentes (Fernández-Alonso et al, 2003 y 2009; Vega, 2004). De igual forma se evidenció la capacidad aglutinante sobre eritrocitos T que

posee el extracto de *Salvia bogotensis*, lo cual no había sido previamente reportado. Las cantidades totales de proteína para evidenciar la aglutinación son muy bajas, mostrando una concentración mínima de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para aglutinar eritrocitos T.

Por SDS-PAGE (Figura 5-25) se observa el perfil de cada uno de los extractos y del precipitado con etanol (con y sin tratamiento con Pectinex®). Los extractos sin tratamiento muestran varias bandas tenues y dos bandas predominantes alrededor de 23 y 30 kDa; con el precipitado tratado con pectinex se observa un número mayor de bandas definidas en 23, 30, 40, y entre 60-23 kDa, siendo predominante una banda alrededor de 40 kDa.

Figura 5-25: SDS-PAGE del extracto proteico de semillas de *Salvia bogotensis*.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. Patrones de Peso Molecular; carril 2. 177 μg de extracto 1; carril 3. 107 μg de extracto 2; carril 4. 55 μg de extracto 3; carril 5. 112 μg de extracto total precipitado con Etanol 60%; carril 6. 51 μg de extracto total precipitado con Etanol 60% y tratado con Pectinex®.

- **Cromatografía de Intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex para extractos proteicos de semillas de *Salvia bogotensis***

Los resultados fueron similares a los obtenidos con la especie *Lepechinia bullata*; en las dos fracciones se encontró una actividad aglutinante apreciable, lo que indica que en esta especie también está presente otra lectina con características bioquímicas diferentes, lo que permite su separación por intercambio iónico (Tabla 5-9, Figura 5-26, Figura 5-27).

Figura 5-26: Perfil cromatográfico de intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex para el extracto proteico de *Salvia bogotensis*.

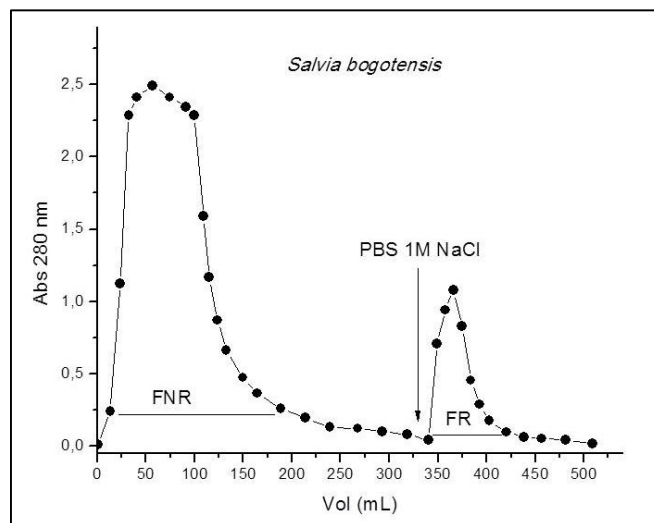
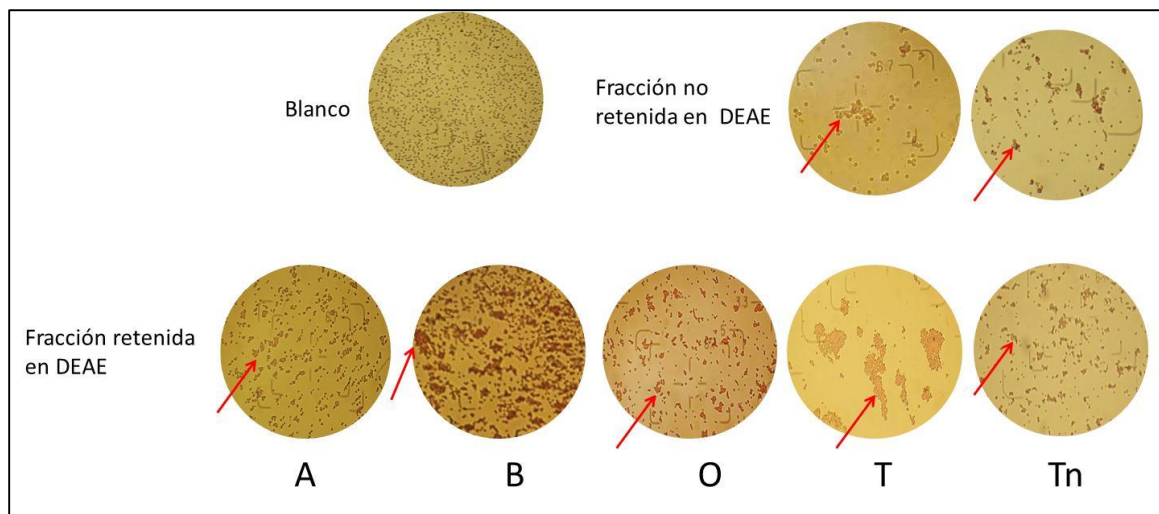


Figura 5-27: Eritroaglutinación de fracciones obtenidas por intercambio aniónico a partir de extractos proteicos de *Salvia bogotensis*.



Ensayo de actividad aglutinante observado al microscopio con un objetivo 10X. Realizado con eritrocitos humanos del sistema ABO y con eritrocitos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo.

Tabla 5-9: Actividad eritroaglutinante de las fracciones obtenidas por intercambio iónico a partir de extractos proteicos de *Salvia bogotensis*.

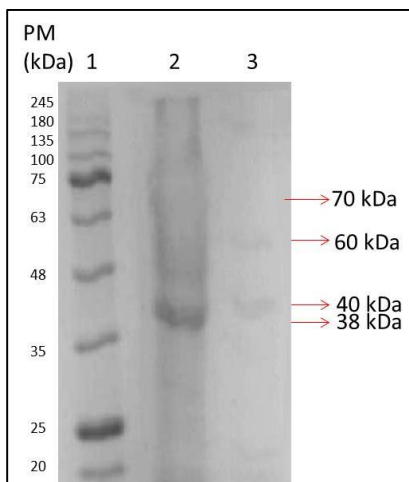
Fracción obtenida en DEAE	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (μL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (μg)	Ensayo de Eritroaglutinación				
				A	B	O	T	Tn
No retenida	0.55	10	5.5	±	±	±	+2	+2
Mínima cantidad (μg) de proteína con la que se observó aglutinación				-	-	-	5.5	2.7
Retenida	0.29	10	2.9	+2	+2	+2	+4	+2
Mínima cantidad (μg) de proteína con la que se observó aglutinación				1.4	1.4	1.4	0.4	1.4

-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte, +4: Aglutinación completa.

Para la fracción no retenida, únicamente se había reportado especificidad por el antígeno Tn (Vega y Pérez, 2006), sin embargo, también se presentó actividad aglutinante sobre eritrocitos T (+2). En el caso de la fracción retenida, se observó aglutinación con todos los grupos evaluados y un título específico de aglutinación mayor con los eritrocitos T (+4; 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

El patrón electroforético por SDS-PAGE se muestra a continuación en la figura 5-28.

Figura 5-28: SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico para *Salvia bogotensis*.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 27.5 μg de la Fracción no retenida en intercambio aniónico; carril 3. 14.5 μg de la Fracción retenida en intercambio aniónico.

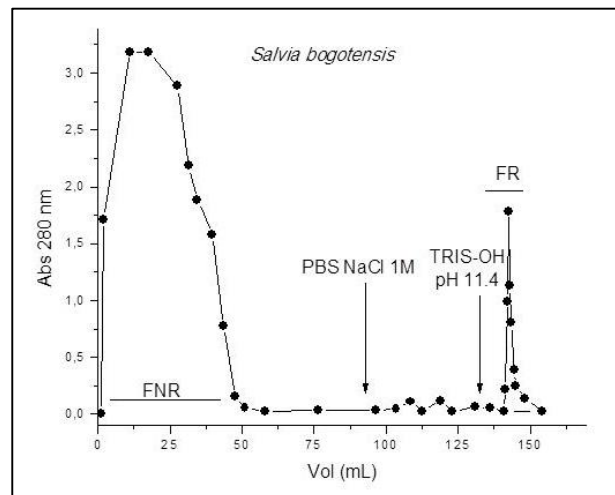
Para la fracción no retenida se observa una banda predominante cercana a los 38 kDa y en la fracción retenida se evidencian bandas alrededor de 40 y 60 kDa, algunas bandas tenues se aprecian por debajo de los 35 kDa. Las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico se sometieron a ultrafiltración con membrana de Amicón®, tamaño de poro 10 kDa con el fin de concentrarlas y equilibrarlas en PBS 1X para continuar su purificación.

La fracción no retenida se llevó a cromatografía de afinidad sobre aMSB para obtener LSBo-I. De otro lado, la fracción retenida se utilizó para purificar la segunda lectina por cromatografía de afinidad con otros ligandos, como se discutirá más adelante.

▪ **Cromatografía de afinidad sobre aMSB-Sepharose 4B para obtener la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I) con reconocimiento por el antígeno Tn**

La fracción retenida que contiene la LSBo-I se neutralizó de inmediato con HCl 0.1 N y posteriormente se equilibró en PBS 1X mediante Centricon® (tamaño de poro 10 kDa). El perfil cromatográfico obtenido a 280 nm se muestra en la figura 5-29.

Figura 5-29: Perfil cromatográfico de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B, para *Salvia bogotensis*.



El comportamiento cromatográfico es el mismo que presentó *Lepchinia bullata*, mostrando una fracción no retenida notoriamente mayor, que se eluye con pH 11.4.

Los resultados de actividad aglutinante se muestran en la tabla 5-10, en la que puede apreciarse que LSBo-I tiene un comportamiento similar a LLb-I, identificándose aglutinación tanto de eritrocitos Tn como de eritrocitos T con cantidades menores a 1 μg de LSBo-I (en concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Previamente fue reportada una concentración mínima de 0.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LSBo-I para generar aglutinación de eritrocitos Tn (Vega y Pérez, 2006), lo cual es mucho más bajo que los valores reportados para Gleheda: 0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en eritrocitos de conejo tratados con tripsina; 44, 176 y 708 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en eritrocitos humanos A, B y O, respectivamente, tratados con tripsina (Wang et al., 2003a).

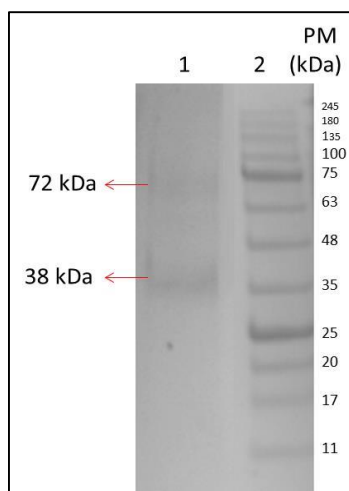
Tabla 5-10: Actividad eritroaglutinante de LSBo-I.

Fracción	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (μL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (μg)	Ensayo de Eritroaglutinación				
				A	B	O	T	Tn
"Retenida" Eluida con pH 11.4	0.42	5	2.1	-	-	-	+3	+3
Mínima cantidad (μg) de proteína con la que se observó aglutinación				-	-	-	0.5	0.5

-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte.

Por SDS-PAGE (figura 5-30) se observaron dos bandas tenues alrededor de 38 y 72 kDa en condiciones denaturantes y reductoras.

Figura 5-30: SDS-PAGE de LSBo-I obtenida por cromatografía de afinidad sobre aMSB – Sepharose 4B para *Salvia bogotensis*.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. 10 μg de la proteína obtenida por cromatografía de afinidad; carril 2. Patrones de peso molecular.

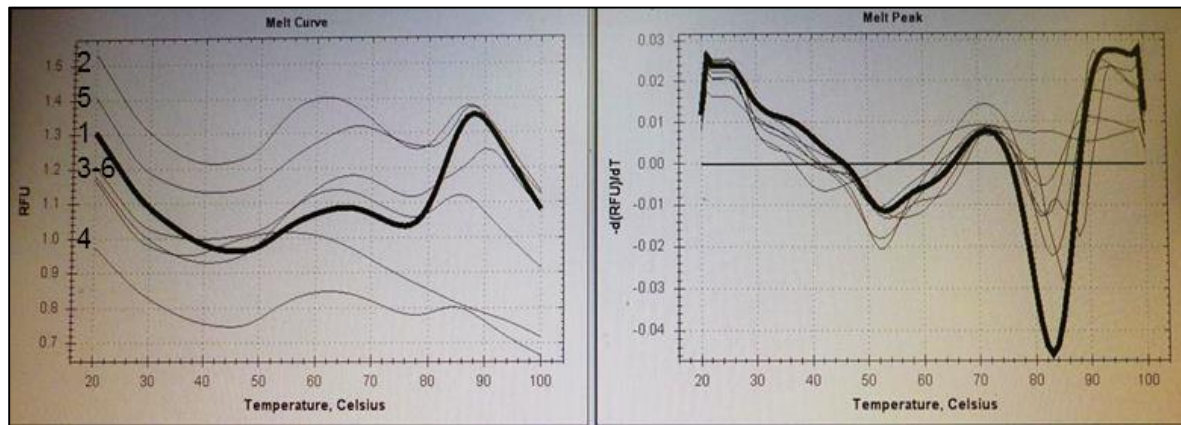
En estudios previos, LSBo-I fue reportada como un dímero con tamaño de 72 kDa cuando la proteína está asociada y de 38702 ± 22 Da (por espectrometría de masas (MS-ES)) en su especie monomérica (Vega y Pérez, 2006).

Después de los procesos de extracción y purificación de la lectina LSBo-I se determinó que partiendo de 50 g de semillas se obtienen entre 6 a 7 mg de la lectina pura. Por cada gramo de proteína total se obtuvo aproximadamente 1.02 mg de LSBo-I, lo que significa un rendimiento del 0.1% sobre el total de proteína extraída y precipitada. Previamente se reportó para *Salvia bogotensis* la obtención de entre 9 a 10 mg de lectina por cada 50 g de semillas (Vega y Pérez, 2006), un valor mayor al determinado en este estudio.

▪ **Determinación de la estabilidad térmica de LSBo-I mediante TSA**

El ensayo se corrió en las mismas condiciones que el descrito para LLb-I en el apartado 5.1.2. Se utilizaron tres concentraciones diferentes de LSBo-I en PBS 1X (0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL) con las cuales se observaron dos temperaturas de melting (53 y 83°C) (Figura 5-31), lo que sugiere la presencia de dos especies de la proteína, probablemente las que corresponden al monómero y al dímero.

Figura 5-31: Resultados de termoestabilidad mediante TSA para LSBo-I.



En el cuadro de la izquierda se observa la curva de melting y en el de la derecha el pico de melting. Resultados obtenidos a partir de dos muestras diferentes de LSBo-I en PBS 1X en concentraciones de 0.5 mg/mL (muestras 1 y 4), 0.2 mg/mL (muestras 2 y 5), 0.1 mg/mL (muestras 3 y 6).

Las curvas que se ven remarcadas en una línea negra y gruesa corresponden a la concentración de 0.5 mg/mL, indicando que el medio en el que se encuentra la lectina, así como la concentración probada son aptas para que permanezca estable.

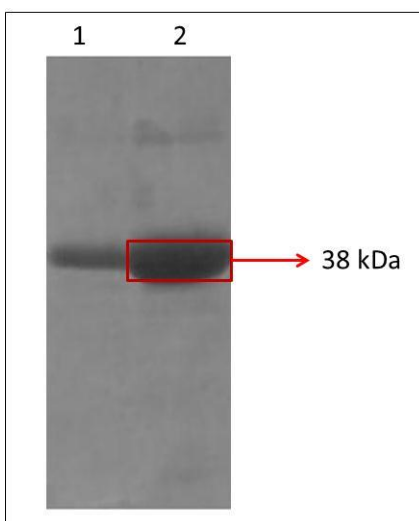
En estudios previos Vega y Pérez (2007) reportaron la pérdida de la actividad aglutinante de LSBo-I por encima de los 65°C, así como la total denaturación y precipitación de la proteína con temperaturas superiores a 80°C, datos que se correlacionan con los encontrados con este ensayo TSA en el que se confirma una denaturación completa de LSBo-I a 83°C.

5.2.2 Determinación parcial de la secuencia de aminoácidos de la lectina de *Salvia bogotensis* con reconocimiento del antígeno Tn/T (LSBo-I)

- **Identificación de la secuencia amino terminal**

La banda del monómero de la LSBo-I, con un peso de 38 kDa (Figura 5-32) fue transferida a membrana de PVDF para obtener la secuencia amino terminal.

Figura 5-32: SDS-PAGE de LSBo-I. Banda transferida a membrana PVDF.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1. 10 µg de LSBo-I; carril 2. 20 µg de LSBo-I.

10 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
 4 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
 de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

El resultado de la secuenciación arrojó el siguiente amino terminal que consta de 20 residuos de aminoácido (anexo I):

(V or A) (K or I) V T S F X Y T S F S S S S D (I or L) (T or K) L Q

Con esta secuencia se realizaron alineamientos con blastp (Altschul et al., 1990), o alineamientos múltiples utilizando clustal Omega versión 1.2.4. (Goujon et al., 2010).

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5-11, en la que puede observarse la similitud que hay en algunos casos entre las secuencias amino terminal de lectinas vegetales de las familias Leguminosa y Lamiácea con reconocimiento por GalNAc, antígeno Tn, lactosa, galactosa, glucosa y manosa.

Tabla 5-11: Alineamiento de secuencias amino terminales de lectinas vegetales con LSBo-I.

Lectina	Reconoce	Secuencia N-terminal	Referencia
<i>Salvia bogotensis</i> -I *	T, Tn	-----AIVTSFX ^Y TSFSSSDIKLQ	Este trabajo
<i>Camptosema ellipticum</i> -II+	GalNAc	-----AIVTSFN ^Y TSFSSSHIKLQ	Batista et al., 2010
<i>Cymbosema roseum</i> -II+	Lac, Gal	-----SGAVHFSFTKFSTSSD ^L TL-	Rocha et al, 2010
<i>Galactia lindenii</i> -P2+	Lac, H2	-----AKVTSIKYTSIS-SSXGKPL	Quintero M., 2014
<i>Vicia villosa</i> – B ₄ +	Tn	-----SEST ^S FSF ^T NFNPNQENLIL	Osinaga et al., 1997
<i>Glechoma hederacea</i> *	Tn	--KTTH--FAVPPAL ^T ALFQGD ^A F-----	Wang et al., 2003a
<i>Salvia miltiorrhiza</i> -I *	N.D.	MAKLLQNLIP ^L LLSAIV ^L LLA-----	Wenping, 2015

En color rojo aparecen resaltados los aminoácidos conservados entre las lectinas analizadas con respecto a la secuencia amino terminal de LSBo-I.

*Pertenece a la familia Lamiaceae. +Pertenece a la familia Leguminosae. GalNAc: N-acetil galactosamina; Lac: lactosa; Gal: galactosa; Glc: glucosa; Man: manosa; N.D: No determinado

Es de resaltar la alta identidad encontrada entre el amino terminal de las lectinas de *Salvia bogotensis* y *Camptosema ellipticum II*, lo que podría indicar que LSBo-I presenta una estructura, reconocimiento y función similar a la Camptosemina.

Camptosema ellipticum es una especie de la familia Leguminosae, tribu *Diocleae*, en cuyas semillas se presenta una lectina homotetramérica con unión a N-acetil-D-galactosamina (Batista et al., 2010). El peso molecular del monómero es de 26 kDa y muestra oligomerización dependiente de pH como el reportado para otras lectinas de Leguminosa

(Nagano et al., 2008). La Camptosemina tiene actividad hemoaglutinante y se ha relacionado con adhesión de células en cáncer de seno (Batista et al., 2010).

- **Secuenciación y análisis bioinformático de la lectina**

La banda del monómero de la LSBo-I, con un peso de 38 kDa fue extraída del gel y tratada con tripsina. Para evaluar la eficiencia de la hidrólisis, los digeridos fueron sometidos inmediatamente a cromatografía líquida y posteriormente a espectrometría de masas.

Inicialmente se identificaron 241 péptidos trípticos *de novo* (Anexo J), los cuales fueron analizados utilizando el programa Decrease redundancy de ExPasy (Artimo et al, 2012) para reducir el número de secuencias peptídicas con un nivel de identidad igual o mayor al 90%, obteniendo 169 péptidos que tenían entre 9 a 30 residuos de aminoácidos (Tabla 5-12):

Tabla 5-12: Secuencia de péptidos obtenidos con tripsina por LC/MS/MS de LSBo-I.

LSEDKNPDYR	AGGGALGVVNP	VGANTYLASGK	LENELQTYR
LSSPATLDSR	QNVQGVDLR	LSFTELDSR	GSCGLGGGLGGSSR
YEELQLTAGR	GSAGGQLGVVNP	LQDMAYDKK	ATGGGLSSVGGGSSTLK
FEETTADGR	VQALEEANNLENK	FSSSSGYGGSSR	APSTYGGGLSVSSSR
TSVLNAEVK	LFEQQNQVLQTK	GTLENSLEETKGR	PSGSTGGYLGAVNPK
TPAQYDASELK	ATFQEALDAAGDK	SKEEAEALNWSK	TLGLSDSQGPTAAK
EELQLTAGR	LSSPATLNSR	TSVHPNPSSNLGR	VGLSAATSGDGVK
FSNSSSSNEFSK	LTDNDLFLTR	KDVDGAYMTK	LGLGRRGGSGSYGR
YEELQQTAGR	LRSELDNVK	VLLSMDNSR	VTATDLDEPDTLHTR
TGGYLGAVNPK	AATSGDGVQK	EVATNSELVQSGK	APSTYGGGLSVSSR
DVDNAYMLK	QSLEASLAETEGR	AGAYEDLAQK	VHAAGTQQPYGLDSR
TTMLLLPNK	STSSFSCLSR	DAEAMAFNEK	LSETNVLLSMDNNR
STMQELDSR	AQYEELAQR	NAENNNPSNNLK	TMQNTSDLDTR
VDPELQNVK	AEAELYQTK	EESNYELEGK	PATPATLNSR
DVDAAYMKN	AGEVQPELR	VTSTLSSNVASK	GEEAMAFNEK
QLLEGEESR	DKYEDELNKR	AALLYDCNGAK	YEELQVTVGR
LAEANADLEQK	LRAELDNVK	NKYEDELNK	VDDGAYMTK
VTMQNLDDR	LDDLEDALQQA	DMQDMVEDYR	GFSSGSAVVSNSR
AEAESLYQSK	NMQDMVEDYR	NVQDALADAEQR	RGVTTAGTTSER
KYEDELNKR	EAEASLYQSK	LNLDQNPGTAPK	LAALMDKPVK
ETQSQLETER	ETAESWYQTK	ALTGALAQK	LKYENEVALR
YLDGLTAER	AQYEDLAQK	YTVVTGNMGSNDK	RSEPLYNSR

10 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
6 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

EVASNSELVQSSR	NKYEDELNKR	EGGDAFEFVGP	SLYNLGGSKR
SMQDVVEDYK	TLLDLNTR	SGFSSVSVSR	FGDSNTVMR
YFSMTEVDR	SKAEAVPDYQSK	LSGYTDNAGVSQK	SLVGLGGTK
STMQELNSR	LSLSTSGGSFR	KDVDNAYMLK	VLDELTLTK
EASLAETEGR	LKFEMEQLNR	QLETLSGDR	LRSELDNVKK
LEVLEELR	VDALMDELNFMK	TNQELQELNR	YDQELMNTK
GTLENSLEETK	ALEESNYELEGK	QGVDAIDLGLR	FFSADLNGLR
TLLEGEESR	SKEEAELYHSK	NVELDPELQK	YDAFAGPSVK
SSPATLNSR	QLQNLLQATSR	PSQQELNQLLK	SLVNLGGSK
AAMLVNQLSK	NVKVDPELQNVK	TLDNDLMLLK	VDDNAYMLK
FLEQQDQVLQTK	TLDNDLMAVK	TEAESSMYQTK	YSGGGGSKGGSLSGGGYSGGGK
QFSSSYLSR	AEGPDLYQSK	LLTHPNFNGD	LLEEGDAHLSSSQFSSGSQSSR
AQYEELANR	AQGELAFSDK	LAQAYYESTR	QSLGHGQHGSQSPSPSR
SSGGFSGGSFSR	TAAEDDFVTLKK	ELTALAPSTMK	RSSGGGGGGLGSGGSLR
MATLLQEQTGK	LSSVLAGGSCR	LGTDTTYAPFSK	LAGGGLSSVGGGSSTLK
TLSDYNLQK	QGVDAIDLGLR	LQGELAHVK	SNGGGGSLSGGGYSGGGSNR
YEELQVTAGR	NSSPATRASR	TNAENEFVTLKK	DPVGHGQHGSQSPSPSR
VTMQNLNDR	LTDNDLMLSR	FLEQQNQVLQTK	GPYESGSGHSSGLGHQESR
TLPEPPMLK	TAAENDFVTLK	SKAEAESLYESK	VAGGGGGFGAAGGFNR
QSVEADLDGLR	LAEESNYELEGK	LQSQFTDAQK	
AAFGGSDLWSSGGYSSGSSSYGSGGR		GYSGGGGSYSGGGGNHGFCSGSSSNYR	

En color azul se resaltan los péptidos que se ubicaron sobre la secuencia de Gleheda; en amarillo los que lo hicieron sobre la lectina de *Salvia miltiorrhiza*; en verde los superpuestos en las dos secuencias. En color rojo se destacan las cinco cisteínas encontradas en los péptidos.

Con el conjunto de péptidos se realizó un BLASTp contra secuencias reportadas para proteínas de la familia Leguminosa, encontrando que algunos de estos presentaban identidad con proteínas de especies como *Cicer arietinum*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Trifolium subterraneum*, entre otras, pero ninguna de ellas correspondió a una lectina (Anexo K); sin embargo, el número de péptidos que presentó identidad con estas especies fue muy bajo (máximo tres en cada especie), por lo tanto se realizó la comparación contra proteínas de las especies de Lamiáceas, generando alineamientos con *Thymus caespitius*, *Origanum vulgare* y *Tectona grandis*, entre otras, sin embargo, tampoco correspondieron a secuencias de lectinas (Anexo L).

En Lamiáceas únicamente se ha reportado la secuencia de lectinas de las especies *Glechoma hederacea* y *Salvia miltiorrhiza*, específicas para el antígeno Tn. La secuencia de la lectina de *Salvia miltiorrhiza* (LSM) fue obtenida a partir de clonación molecular del gen codificado por 822 pb, y fue comparada con varias secuencias de lectinas de Leguminosas, mostrando un rango de identidad entre el 29 y el 43% (Wenping et al., 2015).

Una vez obtenida la lectina recombinante, se verificó su capacidad aglutinante sobre eritrocitos de ratón y de conejo, y su actividad antimicrobiana, aunque el potencial aglutinante fue débil comparado con Gleheda y Con A (Hua et al., 2015). Por su parte Gleheda (lectina obtenida de las hojas de *Glechoma hederacea*) se obtuvo por clonación de un gen de 819 pb que codifica los 273 aminoácidos reportados. Las dos especies están clasificadas entre las “lectinas tipo Leguminosa” debido a su estructura terciaria. El alineamiento de estas dos secuencias mostró un 42% de identidad entre ellas (Figura 5-33).

Figura 5-33: Alineamiento de secuencias de aminoácidos para las lectinas de *Salvia miltiorrhiza* y *Glechoma hederacea*.

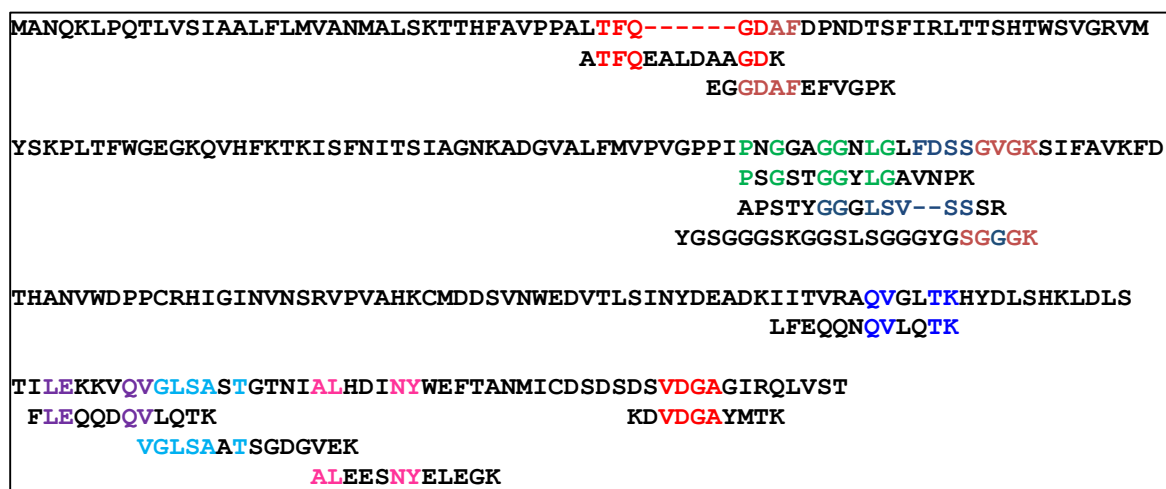
gij 22773748 gb AAN05097.1 lectin [Glechoma hederacea]					
Sequence ID: cl 16443 Length: 263 Number of Matches: 1					
Range 1: 10 to 261 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
173 bits(438)	1e-56	Compositional matrix adjust.	111/264(42%)	155/264(58%)	13/264(4%)
Query	11	LLSAIVLLLLAAANTVRSQTTSFTYDFWGDQPNDLIYQGSAAHFPSRTTFLRLTDALSSQVVG			70
Sbjct	10	L+S L L AN S+IT F P L +QG A P+ T+F+RLT + + VG			63
Query	71	RVVHSNPVQFSQGGNQVDFETTIVNFIITPGPDNTPADGLAFFIAPVGTAPTGSNGANLG			130
Sbjct	64	RV++S P+ F G QV F+I ++F IT N ADG+A F+ PVG P G G NLG			122
Query	131	VFESNGNGAAVFAVEVDTYVNGAWDPLYPHIGIDIGSRASSNTTQVDSSILGQQVTLIN			190
Sbjct	123	+F+S+G G ++FAV+ DT+ N WDP HIGI++ SR +D S+ + VTL IN			181
Query	191	YVGATRMITAKVTAG-SKTFEVSYEYDLSDFVTEQVQVGLSASTGQHVATHDIVSWYFTA			249
Sbjct	182	Y A ++IT + G +K +++S++ DLS + ++VQVGLSASTG ++A HDI W FTA			241
Query	250	TMVQSKAVARSRKELAGNIIRQFV	273 → Lectina de <i>Salvia miltiorrhiza</i>		
Sbjct	242	M+ + G IRQ V	261 → Lectina de <i>Glechoma hederacea</i>		
		NMI----CSDSDSDVDGAGIRQLV			

Teniendo en cuenta la escasez de información publicada y relacionada con lectinas de Lamiáceas, las secuencias de estas dos lectinas se utilizaron como molde para comparar los péptidos de LSBo-I obtenidos por digestión. Lo anterior permitió analizar los

alineamientos resultantes y evaluar la posibilidad de hacer una superposición de secuencias (Tabla 5-12).

Sobre la estructura primaria de Gleheda (Anexo M) se ubicaron 10 péptidos trípticos de LSBo-I, correspondientes a 95 aminoácidos, cubriendo aproximadamente el 36% del total de la secuencia de Gleheda (Figura 5-34).

Figura 5-34: Alineamiento de péptidos trípticos de LSBo-I contra la secuencia de la lectina de *Glechoma hederácea*.



Las secuencias resaltadas en colores sobre los péptidos y sobre la secuencia principal (secuencia sin espacios, escrita en su mayoría con color negro) corresponden a los péptidos que se alinearon parcial o totalmente.

Con la secuencia de la lectina de *Salvia miltiorrhiza* (Anexo N), la cual tiene 273 aminoácidos en su secuencia, se alinearon 17 péptidos de la LSBo-I, con un cubrimiento del 66% de la secuencia de *Salvia miltiorrhiza*. Uno de los péptidos cubrió el extremo amino terminal de LSM y se lograron alinear 181 aminoácidos de los 347 reportados para LSBo-I (Vega y Pérez, 2006), lo que corresponde a un cubrimiento de la secuencia cercano al 52% (Figura 5-35).

Figura 5-35: Alineamiento de péptidos trípticos de LSBo-I contra la secuencia de la lectina de *Salvia miltiorrhiza*.

```

MAKLLQNLIPLLSAIVLLAAANTVRSQTTSFTYDFWGDQPNDLIYQGS AHFPSRTTFLRLTDALSSQVG
MATLLQEQGTK      TLLDLNTR      LLTHPNFNGD      ALTGALAQK
  QLQNLQATSR      QSLGHGQHGS GSGQSPSPSR

RVVHSNPVQFSQGGNQVDFETT VNFIIITPGPDNTPADGLAFFIAPVGTAPTGSNGANLGVFESNGNGAA
TSVHPNPSSNLGR      PSGSTGGYLGAVNPK
      EGGDA--FEFVGPK

VFAVEVDTYVNGAWDPLYPHIGIDIGSRASSNTTQVDSSILGQQVTLINIVGATRMITAKVTAGSKTFF
QGV DAD--LNGLR      EVASNSELVQSSR      YEELQVTAGR
      GSYSGGGGSGYSGGGGNHGFCGSGSSSNYR
      GPYESGSGHSSGLGHQESR

VSVEYDLSDFVTEQVQVGLSASTGQHVATHDIVSWYFTATMVQSKAVARSRKELAGNIIRQFV
VE-EL-----QVTVGR
      TAAEDDFVTLKK
      VGLSAATSGDGVEK

```

A la secuencia obtenida por superposición de péptidos se le realizó un alineamiento múltiple con la lectina de *Salvia miltiorrhiza* y Gleheda, permitiendo asignar 35 residuos adicionales que son conservados entre estas dos lectinas y que correspondieron a sitios en los que no se había identificado el aminoácido (Figura 5-36).

Figura 5-36: Alineamiento múltiple de la secuencia obtenida de LSBo-I, Gleheda y la lectina de *Salvia miltiorrhiza*.

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

sbol  --MATLLQNLLTATSRxxTLLDLNTRxSxTLLTHPNFNGDLGHGQHGS GSGQSPSPSRF  58
smil  --MAKLLQNLIPLLSAIVLLAAANTVRSQTTSFTYDFWGDQPNDLIYQGS AHFPSRTT  58
gleh  MANQKLPQTLVSI---AALFLMVANMALSKTTHF-----AVPPALTFQGD AFDPNDSF  51

sbol  xALTGALAQKVGTSVHPNPSSNLEGGDAFEFVGPKxFxITxxxx--xADGxAxFxxPVGx  116
smil  LRLTDALSSQVGRVHSNPVQFSQGGNQVDFETT VNFIIITPGPDNTPADGLAFFIAPVGT  118
gleh  IRLTTSHTWSVGRVMYSKPLTFWEGEKQVHF KTKISFNITSIA-GNKADGVALFMVPVGP  110

sbol  xxPSGSTGGYLGAVNPKGxGxxxQGV DADLNG-GSYSGGGGNHGFCGSGSSSNSELVQS  175
smil  TAPTGSNGANLGVFESNGNGAAVFAVEVDTYVNGAWDPLYPHIGIDIGSRASSNTTQVDS  178
gleh  PIPNGGAGGNLGLFDSSGVGKSIFAVKFDTHA-NVWDPPCRHRIGINVNSRVPVAHKCMDD  169

sbol  SGLGHQESRxINy-xxxxYEELQVTAG-RKxxxxSYEAELDDFVTLQVTVGLSAATSGDG  233
smil  SILGQQVTLINIVGATRMITAKVTAG-SKTFEVSYEYDLSDFVTEQVQVGLSASTGQHV  237
gleh  SVNWEDVTL SINYDEADKIITVRAQVGLTKHYDL SHKLDLSTILEKKVQVGLSASTGTNI  229

sbol  VEKDIxxWxFtAxMxxxxxxxxxxxxxxxxGxxIRQxV--  269
smil  ATHDIVSWYFTATMVQSKAVARSRKELAGNIIRQFV--  273
gleh  ALHDINYWEFTANMICSDS----DSVDGAGIRQLVST  263

```

sbol: Secuencia deducida de LSBo-I; smil: Secuencia de *Salvia miltiorrhiza*; gleh: Secuencia de Gleheda. x indica la posición en la que no se identificó el aminoácido. Resaltado en rojo están los residuos asignados por comparación con las secuencias molde.

La secuencia propuesta tiene 274 residuos, de los cuales 216 aminoácidos fueron ubicados o asignados en los alineamientos (Figura 5-37) lo que corresponde al 62% del total de los 347 residuos reportados previamente para LSBo-I (Vega y Pérez, 2006).

Figura 5-37: Secuencia parcial de LSBo-I

10	20	30	40	50	60
MATLLQNLLT	ATSRxxTLLD	LDNTRxSxTL	LTHPNFNGDL	GHGQHGSXGSG	QSPSPSRFxA
70	80	90	100	110	120
LTGALAQKVG	TSVHPNPSSN	LEGGDAFEFV	GPKxFxITxx	xxxxxADGxA	xFxxPVGxxx
130	140	150	160	170	180
PSGSTGGYLG	AVNPKGxGxx	xQGVDA DLNG	xGSYGSXGGGG	NHGFCGSXGSS	SNSELVQSSG
190	200	210	220	230	240
LGHQESRxIN	YxxxxxYEEL	QVTAGxRKxx	xxSYEAELDD	FVTLQVTVGL	SAATSXGDGVE
250	260	270	274		
KDIxxWxFTA	xMxxxxxxxxx	xxxxxxGxxI	RQxV		

Los residuos resaltados en rojo corresponden a aminoácidos importantes para el reconocimiento de los antígenos T y Tn, que han sido reportados en otras lectinas con especificidad por el antígeno T o Tn. x indica la posición en la que no se identificó el aminoácido.

Tomando como base la secuencia parcial de LSBo-I (Figura 5-37), en la tabla 5-13 se presentan los análisis de aminoácidos obtenidos por hidrólisis total de la proteína (Vega y Pérez, 2006) y el realizado en este trabajo a partir de la secuencia parcial de la LSBo-I.

Los resultados son comparables con los encontrados previamente por Vega y Pérez (2006), en los que se reportó una alta cantidad de residuos de glicina, serina, leucina, alanina y glutamina/Ácido glutámico. También se había reportado la presencia de cuatro Cisteínas en LSBo-I que formaban dos puentes disulfuro intracatenarios, y que no estaban en forma de tioles libres (Vega y Pérez, 2006), sin embargo, dentro de la secuencia solamente logró ubicarse una de las cisteínas a pesar de que se encontraron cinco en los péptidos tripsinizados, lo que podría indicar que los demás residuos de cisteína están ubicados en las regiones que aún no han sido determinadas (tabla 5-13).

En la secuencia reportada para la lectina de *Salvia miltiorrhiza* no se reportaron cisteínas (Hua et al., 2015), mientras que en la de Gleheda se reportaron tres, que son las que hacen parte de los puentes disulfuro presentes en esa lectina (Wang et al., 2013a).

Tabla 5-13: Aminoácidos encontrados en la secuencia parcial deducida para LSBo-I

Aminoácido			N° de residuos (Este trabajo)	N° de residuos (Vega y Pérez, 2006)
1	Ala	A	15	36
2	Cys	C	1	4
3	Asp	D	11	*
4	Glu	E	9	*
5	Phe	F	9	4
6	Gly	G	37	92
7	His	H	6	4
8	Ile	I	4	6
9	Lys	K	5	21
10	Leu	L	21	10
11	Met	M	2	0
12	Asn	N	11	15 (Asx)
13	Pro	P	9	13
14	Gln	Q	10	42 (Glx)
15	Arg	R	6	3
16	Ser	S	25	60
17	Thr	T	16	13
18	Val	V	13	10
19	Trp	W	1	9
20	Tyr	Y	5	5
No determinados (x)			58	0
N° total de residuos			274	347

Teniendo en cuenta las secuencias de lectinas de diferentes familias taxonómicas con especificidad por los antígenos T y Tn, se identificaron algunos aminoácidos importantes en la interacción con el azúcar, que están presentes en la secuencia de LSBo-I propuesta (resaltados color rojo en la figura 5-37).

En la estructura primaria de la *Vicia villosa* isolectina B₄ (VVLB₄), los residuos Asp85, Gly103, Asn129 y Asn214 hacen parte de una red de ocho puentes de hidrógeno formados con el O3, O4, O6 y el grupo N-acetil del GalNAc del antígeno Tn, generando un sitio conservado para la unión a carbohidrato. La Tyr127 se identificó como un aminoácido importante en la interacción de VVLB₄ con el anillo piranósido del GalNAc y en la formación de un puente de hidrógeno entre el OH de la Tyr y el NH de la serina en el antígeno Tn, interacciones que son determinantes para la especificidad de esta lectina (Babino et al., 2003). En la secuencia parcial de LSB₀-I se encontró Asp85, Tyr128 y Asn133 (Figura 5-37), aminoácidos que podrían estar implicados en la interacción con GalNAc.

En la lectina de *Vatairea macrocarpa*, especie perteneciente a la familia Leguminosae, y que reconoce el antígeno Tn, el anillo del azúcar se ubica entre el grupo aromático de Phe129 y la cadena alifática de Leu215 como se muestra en la figura 5-38. Los puentes de hidrógeno se presentan entre los grupos 3-OH, 4-OH and 6-OH, así como el carbonilo del grupo N-acetil con Gly107 y las cadenas laterales de Leu215, Ser216, Asp109 y Asn131 (Sousa et al., 2016).

Figura 5-38: Acoplamiento molecular de la lectina de *Vatairea macrocarpa* con el antígeno Tn.

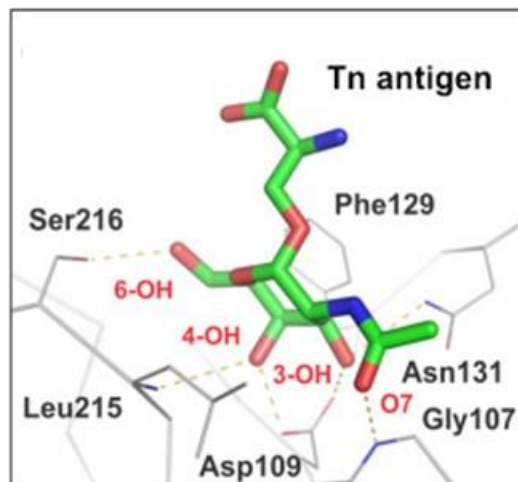


Figura tomada de Sousa et al., 2016. El antígeno Tn se muestra en color verde. Los puentes de hidrógeno se representan por líneas punteadas amarillas. Se muestran los aminoácidos presentes en el sitio de unión.

En la secuencia deducida de LSBo-I están presentes la mayoría de estos aminoácidos en posiciones similares Gly108, Leu218, Ser213, Asp107y Asn133, lo que podría indicar que el sitio de unión a carbohidrato de estas dos lectinas es similar y los aminoácidos presentes pueden interactuar de forma parecida.

Estudios de reconocimiento en lectinas de la familia *Moraceae* mostraron que el sitio de unión a carbohidrato de *Maclura pomífera* (Lee et al., 1998) y de jacalina, lectina de *Artocarpus integrifolia* (Jeyaprakash et al., 2002), interactúa con el antígeno T de forma similar, mediante el residuo de GalNAc a través de la formación de nueve puentes de hidrógeno entre O4, O5, O6 y el grupo N-acetil con Gly1, Gly121, Tyr122, Trp123 y Asp125; también se presenta un puente de hidrógeno entre la Gly1 y el O3 que actúa en el enlace 1-3 glucosídico de Gal y GalNAc en el antígeno T. En LSBo-I se identificó el aminoácido Gly126 (Figura 5-37), que puede estar interactuando con el antígeno T.

En la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) se reporta que el sitio de unión a carbohidrato genera ocho puentes de hidrógeno entre el O1, O3, O4 y O5 de Gal (presente en el antígeno T) con los aminoácidos Asp83, Gly104, Asn127 y Ser211. El anillo piranosídico de Gal interactúa con la Tyr125. El residuo GalNAc sobresale del sitio de unión a carbohidrato e interactúa mediante dos enlaces de hidrógeno con Ser211 y Gly212 (Ravishankar, 1997). En la secuencia parcial propuesta para LSBo-I se identificaron Asp85, Gly108, Asn133, Tyr128 y Ser213 (Figura 5-37) residuos que podrían estar relacionados con el reconocimiento del antígeno T.

De otro lado, en la lectina dimérica de *Amaranthus caudatus* (Amarantina), perteneciente a la familia *Amaranthaceae*, se encontró que residuos ubicados en los dos monómeros de la estructura forman el sitio de unión a carbohidrato, reconociendo específicamente el antígeno T. Este sitio está conformado por Asn74, His75, Tyr76, Trp77 y Gln262, y presenta interacciones mediadas por cinco puentes de hidrógeno con la Gal y tres con GalNAc (Figura 5-39). La especificidad en el reconocimiento también está generada por algunas moléculas de agua presentes, que forman puentes de hidrógeno con los dos monosacáridos del antígeno T (Transue et al., 1997).

Figura 5-39: Acoplamiento molecular de Amarantina con el antígeno T.

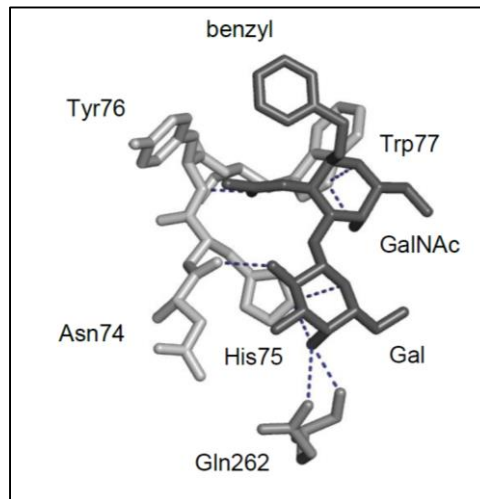


Figura tomada de Rougé et al., 2011. Algunos de los aminoácidos presentes en el sitio de unión de la Amarantina se muestran en gris claro. El antígeno T se representa en gris oscuro. Los puentes de hidrógeno se muestran con líneas punteadas.

En la secuencia parcial propuesta para LSBo-I, se identifican los residuos de His74 y Asn76 (Figura 5-37), que podrían estar involucrados en la interacción con el antígeno T y tener un mecanismo de reconocimiento similar al planteado en Amarantina.

En la familia Lamiaceae, estudios de Gleheda reportaron una interacción con el antígeno Tn similar a la establecida en VVLB₄, en la que se genera una red de puentes de hidrógeno con Asp, Gly y Asn. En el caso de Gleheda se presentan puentes de hidrógeno entre O3, O4, O5, O6 y el grupo N-acetil del GalNAc con los aminoácidos Asp73, Gly93, Asn117, Thr201 y Asn202 (Figura 5-40). La His115 interactúa con el anillo piranosa de azúcar (Wang et al., 2003a).

En LSBo-I los aminoácidos Gly93, Gln201 y Thr203 están en la secuencia parcial elucidada (Figura 5-37) y podrían tener una interacción similar a la planteada para Gleheda.

Para la lectina de *Salvia miltiorrhiza* son importantes Asp107, Ala139, Asn151, Gly234, Gln235 e His236 en el sitio de interacción con el carbohidrato (Wenping, 2015); en la secuencia de LSBo-I los aminoácidos Asn149 y Gly 236 están en posiciones cercanas (Figura 5-37), lo que podría sugerir que son también residuos críticos en el reconocimiento del antígeno Tn.

Figura 5-40: Acoplamiento molecular de Gleheda con el antígeno Tn.

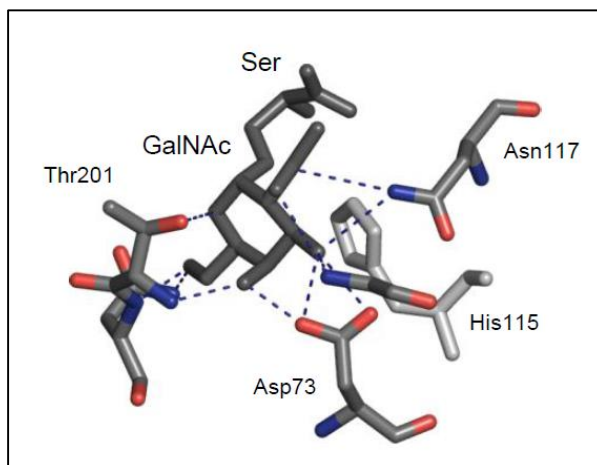


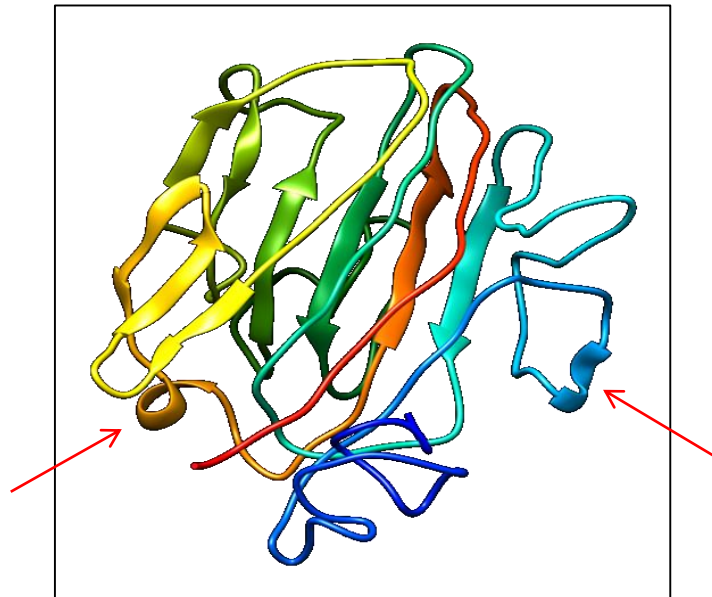
Figura tomada de Wang et al., 2003a. El antígeno Tn se muestra en gris oscuro y la His115 en gris claro. Los puentes de hidrógeno se representan con líneas punteadas.

Por otra parte los genes que codifican para Gleheda y para la lectina de *Salvia miltiorrhiza* presentan alta similaridad entre ellos y con genes de lectinas de la familia *Fabaceae* (Wang et al., 2003a), y 42% de identidad entre sus estructuras proteicas; lo anterior es una evidencia de las lectinas tipo Leguminosa en otras familias taxonómicas, lo que también indicaría que evolutivamente estas lectinas provienen de un ancestro común (Wang et al., 2003a; Wenping et al., 2015), y reforzaría la idea de que las lectinas con reconocimiento por manosa encontradas en este estudio, y de las que se hablará más adelante en el apartado 5.4, podrían también tener una estructura altamente similar a las reportadas para lectinas con especificidad Man/Glc presentes en otras familias taxonómicas.

Con la secuencia parcial de LSB0-I se realizó una aproximación a la estructura terciaria mediante análisis bioinformático utilizando I-Tasser, método basado en la generación de estructuras por comparación con otras de referencia, previamente reportadas (Zhang, 2008).

En la figura 5-41 se muestra el modelo de LSB0-I generado por I-Tasser, que presentó el valor C-score más alto.

Figura 5-41: Modelo de LSB0-I obtenido por I-Tasser.



El modelo se representa desde el extremo amino terminal (en color azul oscuro) y finaliza en el extremo carboxilo terminal (color rojo). Las flechas planas representan las hebras β , las cintas señaladas con flechas rojas simbolizan regiones con tendencia a hélice alfa, y los segmentos delgados corresponden a estructuras aleatorias (random coil).

El modelo de estructura terciaria de LSBo-I tiene un n , valor que se encuentra entre los límites establecidos (-5 a 2), indicando que es una predicción adecuada (Zhang, 2008). A pesar de que aún faltan aminoácidos por asignar a la secuencia, residuos que evidentemente contribuirían a modelar las regiones faltantes y a obtener una predicción más acertada, el modelo mostró homología con la estructura terciaria de lectinas vegetales al presentar nueve hebras beta en el modelo, las cuales están unidas entre sí por estructuras *random coil*. También presentó dos regiones con tendencia a ser hélice alfa (señaladas con flechas), la primera en el amino terminal (simbolizada en color azul), y la segunda ubicada entre las hebras 8 y 9 (representada en color anaranjado).

La presencia de hélices alfa no es característica de las lectinas tipo Leguminosa, pero puede deberse a las regiones de aminoácidos que aún no han sido totalmente determinadas.

Las proteínas que estructuralmente se acercaron más al modelo, según los datos reportados en el PDB, son lectinas de especies pertenecientes a la familia Leguminosae, y fueron seleccionadas por el programa de alineamiento estructural TM-align (I-Tasser

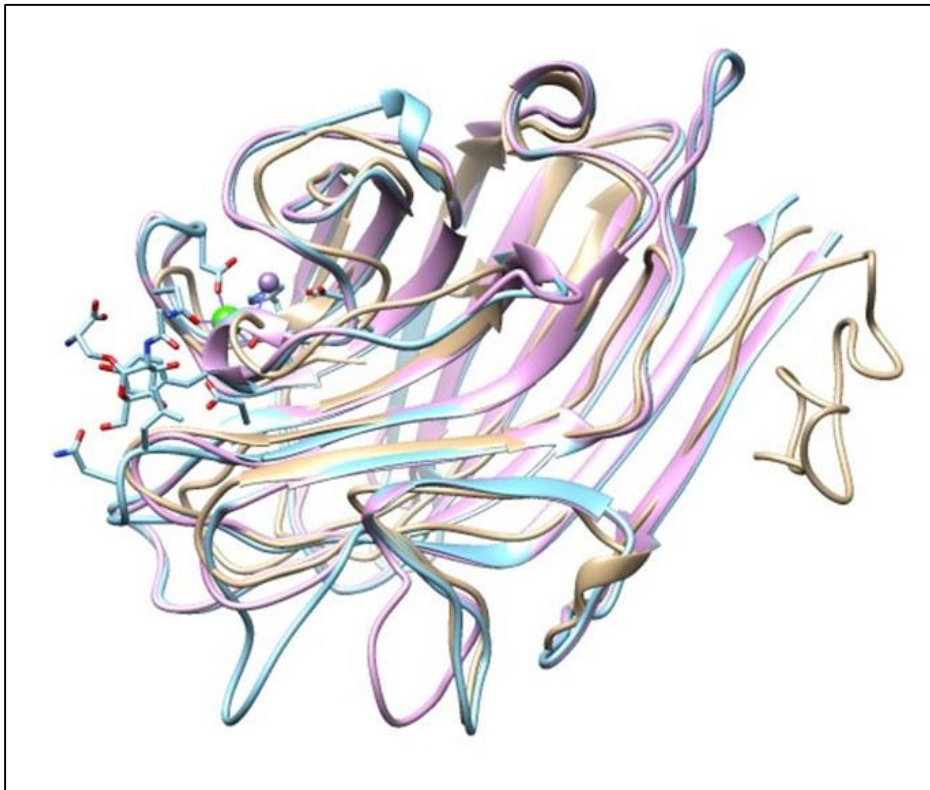
server), tomando como referencia los TM-score más altos, lo cual significa mayor cercanía entre la estructura conocida (PDB) y la estructura modelada (Zhang, 2008).

Las cinco proteínas más cercanas estructuralmente fueron la lectina de *Wisteria floribunda* en complejo con GalNAc (PDB 5kxbA), que reconoce estructuras con terminación GalNAc (Haji-Ghassemmi et al., 2016); la lectina de semillas de *Butea monosperma* (PDB 3usuA) que interactúa principalmente con Galactosa (Abhilash et al., 2015); la lectina de semillas de *Spatholobus parviflorus* (PDB 3ipvA) específica por Galactosa (Geethanandan et al., 2011); la lectina de *Erythrina corallodendron* en complejo con D-Galactosa (PDB 1axz_) que reconoce Galactosa, GalNAc, Lactosa y LacNAc (Elgavish y Shaanan, 1998) y la isolectina B₄ de *Vicia villosa* en complejo con el antígeno Tn (PDB 1n47A), la cual es altamente específica por este ligando (Babino et al., 003).

Estos resultados corroboran lo observado en los ensayos de aglutinación; LSBo-I reconoció los eritrocitos T y Tn (con terminaciones en Gal y GalNAc respectivamente), sugiriendo que el sitio de unión puede ser similar al de lectinas que reconocen alguno de estos carbohidratos.

Para evidenciar la similitud estructural encontrada entre LSBo-I y otras lectinas vegetales como *Vicia villosa* (isolectina B₄) y *Salvia miltiorrhiza*, se realizó un alineamiento estructural con UCSF Chimera, lo que permitió observar la disposición de las hebras β en la estructura, así como la localización del sitio de reconocimiento a carbohidrato (Figura 5-42).

Figura 5-42: Alineamiento tridimensional de las lectinas de *Salvia bogotensis*-I, *Salvia miltiorrhiza*-II y *Vicia villosa* Isolectina B₄ utilizando UCSF Chimera.



En color beige se observa el modelo de LSBo-I, en azul claro se presenta SML-II y en magenta se muestra VVB₄.

En la estructura de LSBo-I se observan algunas regiones con estructura secundaria aleatoria en donde SML-II y VVB₄ muestran hebras β , lo cual era de esperarse debido a que el análisis se realizó sobre una secuencia parcial. Probablemente al completar la asignación de aminoácidos a la estructura primaria se encontrará un mejor ajuste de los modelos tridimensionales y se podrán establecer algunas otras características estructurales.

La predicción del posible ligando se realizó también por I-Tasser seleccionando el modelo según el rango del C-score (0-1) teniendo en cuenta que entre más alto el score, la predicción es más confiable (Yang, 2013).

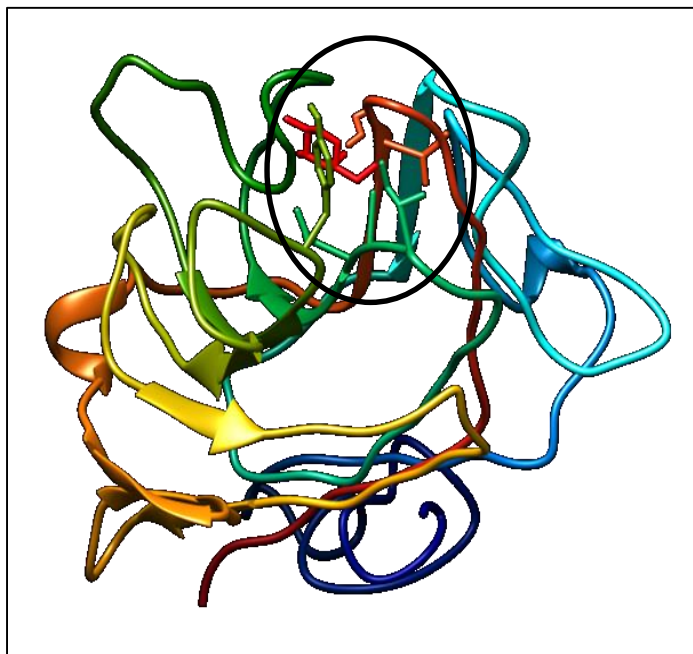
La Galactosa presentó un C-score de 0.64, siendo el más alto entre las opciones mostradas para ligandos con el modelo de LSBo-I, y postulando algunos residuos de

aminoácido que pudieran estar presentes en el sitio de unión a carbohidrato: Gln67, Ala106, Asp107, Gly126, Gly127, Tyr128, Ser156, Ser235, Gly236 y Asp237.

En el análisis realizado anteriormente se postularon los aminoácidos Asp107, Gly126 y Tyr128 entre otros, como importantes para el reconocimiento del ligando. Estos tres residuos están presentes en el sitio de unión a carbohidrato predicho por I-Tasser, lo cual corrobora la similitud entre estructuras de lectinas vegetales.

En la figura 5-43 puede observarse el sitio de unión a carbohidrato, analizado por I-Tasser, en el que se muestra la Galactosa como posible ligando.

Figura 5-43: Modelo del sitio de unión a carbohidrato en LSBo-I obtenido por I-Tasser.



En el óvalo negro se señala el ligando galactosa (galactopiranososa) en color rojo, rodeado por las cadenas laterales de Ala106, Asp107, Tyr128, Thr234 y Ser235. Las flechas planas representan las hebras β y las cintas las estructuras aleatorias (random coil).

La figura anterior sugiere una posible interacción entre aminoácidos presentes en el sitio activo de LSBo-I. Las cadenas laterales de Ala106 y Asp107 (azul claro), Tyr128 (verde), Thr234 y Ser235 (anaranjado) están presentes en el sitio de unión de la Galactosa (rojo), por lo que pudieran estar participando en el reconocimiento lectina-carbohidrato. Como se discutió anteriormente, se ha identificado la Tyr128 como un aminoácido importante en la

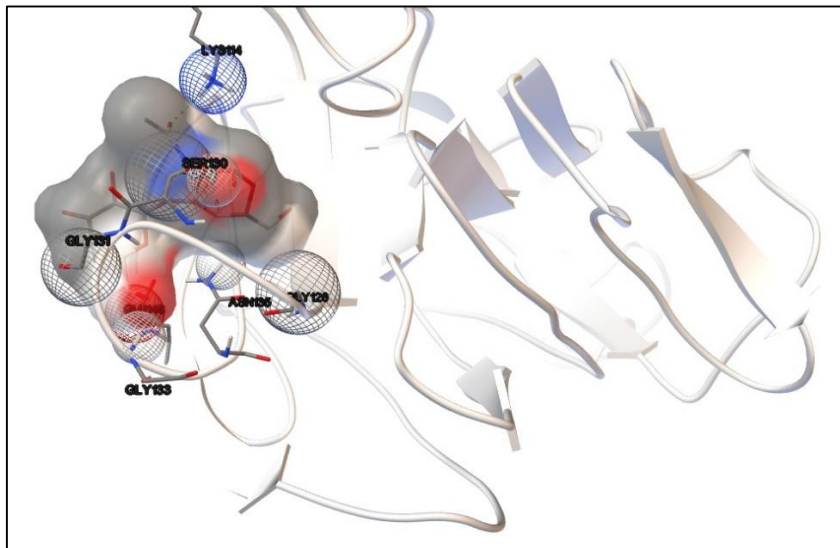
especificidad de lectinas con reconocimiento por el antígeno T/Tn, por lo tanto, podría proponerse que en LSBo-I este residuo también interactúa con el anillo piranósido de la galactosa.

Una vez identificado el sitio de unión del ligando se utilizó Autodock Vina con las coordenadas descritas en el apartado 4.2.5, para realizar un docking molecular de LSBo-I con Gal, GalNAc, Antígeno T (Gal β 1-3GalNAc-Ser), Antígeno Tn (GalNAc-Ser) y péptido Tn (GalNAc-heptapéptido (PTTT*PLK)) (Borger *et al.*, 2012).

Para realizar estos acoplamientos se utilizó la secuencia parcial de LSBo-I sin tener en cuenta los residuos que no habían sido asignados, por lo tanto, la posición de los aminoácidos que muestra el modelo se ajustó a la ubicación real en la que aparecen los residuos en la secuencia parcial mostrada en la figura 5-37.

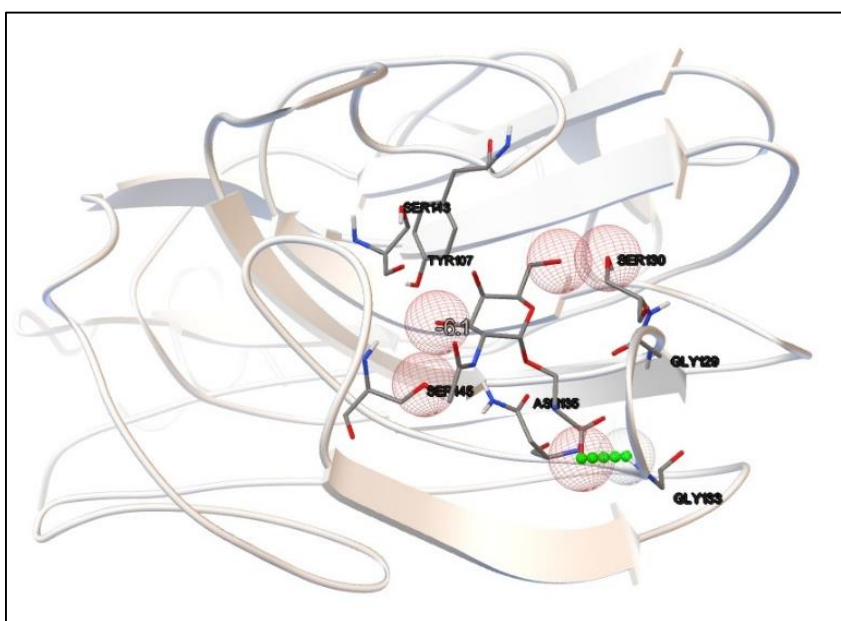
Cada uno de los modelos presentó un valor de energía de unión negativo, indicando que se formó un acoplamiento estable. El complejo que presentó menor energía (Kcal/mol) fue el de LSBo-I – Antígeno T (-6.6) (Figura 5-44), seguido de Antígeno Tn (-6.1) (Figura 5-45), Gal (-5.9) (Figura 5-46), GalNAc (-5.8) (Figura 5-47), y finalmente péptido Tn (-5.5) (Figura 5-48).

Figura 5-44: Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y Antígeno T obtenido por Autodock Vina.



En el complejo se sugiere la interacción del antígeno T con los aminoácidos Lys114, Gly129, Ser130, Gly131, Gly133, Asn135 y Glu138, que corresponden a Lys135, Gly155, Ser156, Gly157, Gly159, Asn161 y Glu174 en la secuencia parcial determinada para LSBo-I. La energía de unión fue de -6.6 Kcal/mol, la menor encontrada entre los modelos generados con diferentes ligandos, por lo que podría sugerirse que la estructura tiene preferencia por la unión con este antígeno, corroborando los hallazgos realizados con los ensayos de aglutinación sobre eritrocitos.

Figura 5-45: Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y Antígeno Tn obtenido por Autodock Vina.



En este modelo se observan los residuos Tyr107, Gly129, Ser130, Gly133, Asn135, Ser143 y Ser145 interactuando en el sitio de unión al ligando. Estos corresponden a Tyr128, Gly155, Ser156, Gly159, Asn161, Ser169 y Ser171 en la secuencia parcial de LSBo-I. Con este resultado se confirma que la Tyr128 es un residuo importante dentro del sitio de unión a carbohidrato, tal como lo es en las lectinas de *Vicia villosa* B₄ (Babino et al., 2003) y *Arachis hypogaea* (PNA) (Ravishankar, 1997), entre otras.

Por otra parte, en el acoplamiento observado para LSBo-I con galactosa, el cual tuvo una energía de unión de -5.9 Kcal/mol, evidenció la presencia de los aminoácidos Asp93, Asn124, Gly126, Gly129, Ser130, Asn135 y Ser145 en el sitio de unión de galactosa, que en la secuencia parcial determinada corresponden a Asp107, Asn149, Gly152, Gly155,

12 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
2 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

Ser156, Asn161 y Ser171. El residuo Asp107 fue también descrito en la interacción de la lectina de *Vatairea macrocarpa* con el antígeno Tn (Sousa et al., 2016).

Figura 5-46: Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y galactosa obtenido por Autodock Vina.

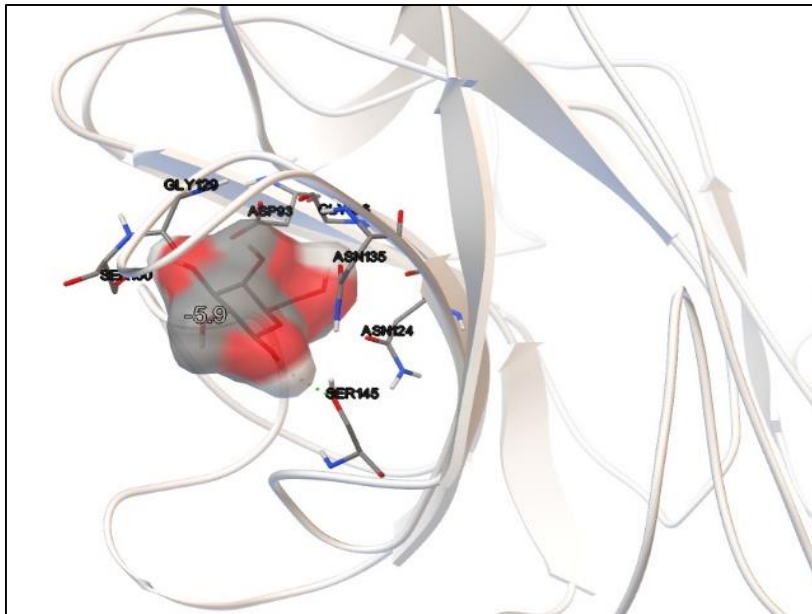
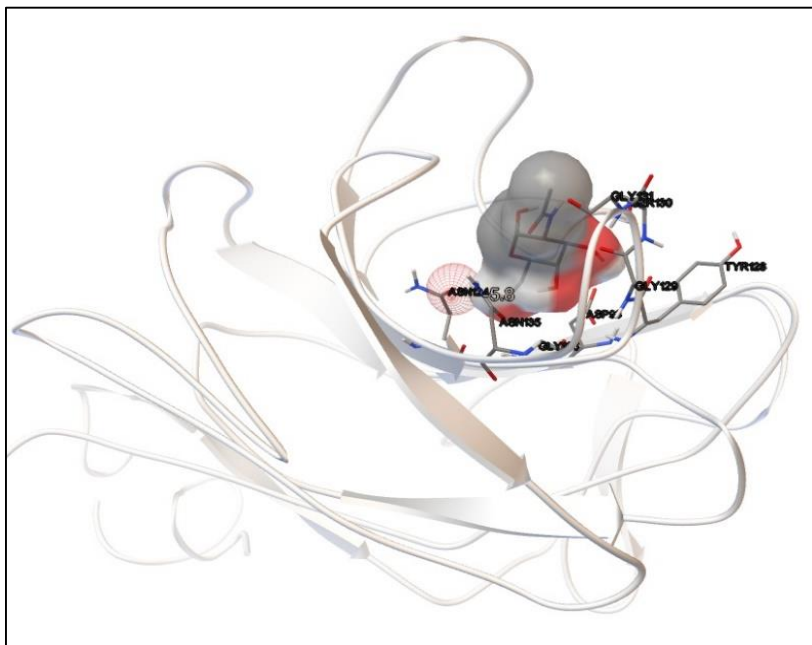


Figura 5-47: Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y N-acetilgalactosamina obtenido por Autodock Vina.

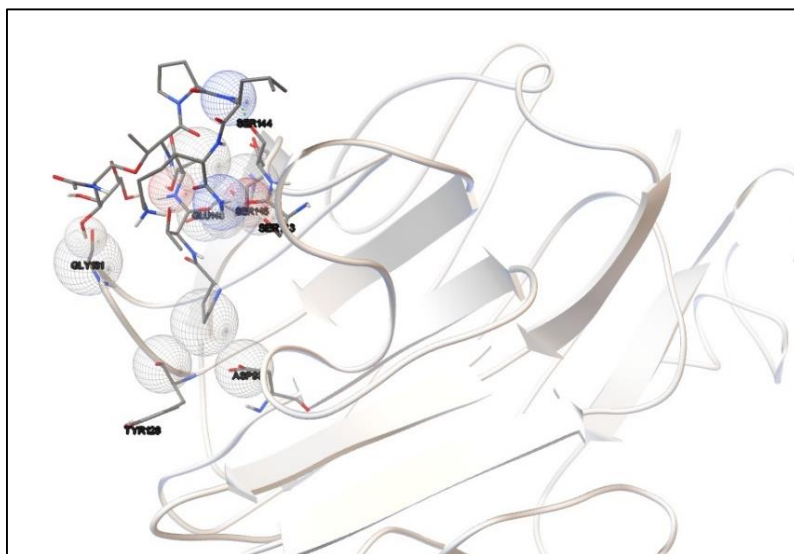


Al acoplamiento generado entre LSBo-I y N-acetilgalactosamina presentó una energía de unión de -5.8 Kcal/mol, lo que sugiere que este complejo es energéticamente favorable.

Los aminoácidos encontrados en el sitio de unión son Asp93, Asn124, Gly126, Tyr128, Gly129, Ser130, Gly131 y Asn135, que corresponden a Asp107, Asn149, Gly152, Tyr154, Gly155, Ser156, Gly157 y Asn161. Los residuos presentes en la interacción con GalNAc son similares a los encontrados en el modelo anterior (LSBo-I y galactosa), por lo tanto podría indicar que el reconocimiento que ejerce LSBo-I sobre los dos carbohidratos se da de forma semejante, destacándose también el Asp107, reportado en el sitio de unión de otras lectinas.

En la figura 5-48 se aprecia el complejo generado por predicción entre LSBo-I y el antígeno Tn asociado a un heptapéptido. Este modelo presentó una energía de unión de -5.5 Kcal/mol y sugiere una interacción entre el ligando y los aminoácidos Asp93, Tyr128, Gly131, Ser143, Ser144 y Glu148. Tomando como base la secuencia parcial deducida para LSBo-I, los residuos corresponderían a Asp107, Tyr154, Gly157, Ser169, Ser170 y Glu174; una vez más, aparece en el sitio de unión el Asp107, tal como se observó en la unión con Gal y GalNAc.

Figura 5-48: Modelo de acoplamiento entre LSBo-I y Tn-péptido obtenido por Autodock Vina.



- 12 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
4 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

En resumen, los aminoácidos descritos para el sitio de unión de LSB0-I son similares entre los ligandos acoplados, sin embargo se destacan algunos como Asp107, Gly155, Ser156, Gly157, Asn161, que se reportan interactuando con varios de los ligandos modelados.

En la siguiente tabla (5-14) se muestran las posiciones y los aminoácidos identificados en el sitio de unión de LSB0-I, y el ligando con el cual se presenta la interacción.

Tabla 5-14: Aminoácidos identificados en el sitio de unión de LSB0-I, que presentan interacción con los ligandos ensayados.

Ligando Residuo	Antígeno T	Antígeno Tn	Galactosa	N-acetil galactosamina	Tn-péptido
Asp107			X	X	X
Tyr128		X			
Lys135	X				
Asn149			X	X	
Gly152			X	X	
Tyr154				X	X
Gly155	X	X	X	X	
Ser156	X	X	X	X	
Gly157	X			X	X
Gly159	X	X			
Asn161	X	X	X	X	
Ser169		X			X
Ser170					X
Ser171		X	X		
Glu174	X				X

5.3 Ensayos preliminares para la obtención de LLb-I recombinante

La mayoría de las lectinas de plantas ha sido aislada de semillas, especialmente de Leguminosas dicotiledóneas, debido a que éstas se almacenan durante el proceso de maduración; constituyen el 10% del total de la proteína en la semilla, aunque las cantidades aisladas son más bajas entre 0.1-1%. También se encuentran en tejidos vegetales, como tallo, raíz y hojas pero su abundancia es mucho menor y está regulada durante el proceso de desarrollo de la planta (Etzler et al., 1999; Sharon y Lis, 2003).

Por lo anterior, varios de los estudios enfocados a la obtención de lectinas recombinantes se han realizado a partir de las semillas (Loris et al., 1998; Van Damme et al., 1998; Sharon y Lis, 1990), hojas y otros tejidos vegetales.

5.3.1 Extracción de ARN a partir de semillas de *Lepechinia bullata*

Se seleccionaron semillas de aproximadamente 2 mm de longitud, caracterizadas por un color verde brillante y una textura húmeda y suave, las cuales fueron separadas del resto de material vegetal, lavadas con etanol e hipoclorito de sodio y almacenadas en crioviales a -80° (Figura 5-49).

Figura 5-49: Semillas de *Lepechinia bullata* en estado inmaduro.



La extracción de ARN se hizo a partir de las semillas congeladas, pulverizándolas en un mortero sobre nitrógeno líquido; este proceso se realizó en menos de un minuto por muestra, con el fin de evitar su descongelamiento, la oxidación de las semillas y la degradación del ARN.

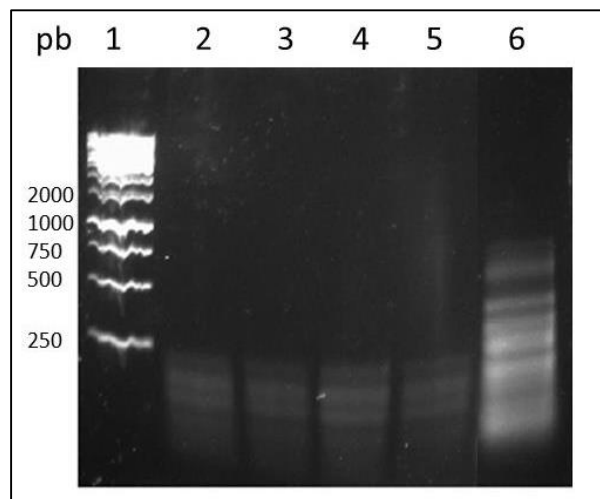
Después de ensayar cinco procedimientos y partiendo de 100 mg de semillas, se observó que hubo diferencia en la calidad y cantidad del ácido nucleico extraído como se muestra en la tabla 5-15. La metodología que permitió obtener mejores resultados en cuanto a concentración de ácido nucleico e integridad del RNA visualizado en gel de agarosa (Figura 5-50), fue el kit *Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro Kit*, de Life Technologies, que posibilitó el posterior uso del ARN en ensayos de amplificación.

Tabla 5-15: Comparación de las características del ARN obtenido con diferentes kits.

Kit comercial	Concentración del ARN obtenido (ng/μL)	Relación 260/280
TRI Reagent®, de Sigma–Aldrich	41.4	1.55
Direct-zol™ RNA miniprep, de Zymo research	40.1	1.21
Aurum™ Total RNA Fatty & Fibrous tissue kit, de Bio-Rad	44.8	1.96
Total RNA isolation from plant tissue or filamentous fungi, de Macherey-Nagel	51.8	1.98
Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro Kit, de Life Technologies	89.7	1.95

El protocolo de Dynabeads mRNA DIRECT™ permitió la obtención directa de mRNA gracias a que las perlas magnéticas cuentan con una cola poli T (cola de timinas que actúan como ligante) que permiten la unión específica de ARN que contenga una cola de poli A (secuencia de adeninas), condición exclusiva del ARN mensajero. Esta característica posibilitó trabajar solamente con ARN codificante para proteínas. El ARN obtenido se trató con ADNasa con el fin de disminuir cualquier contaminación con ADN.

Figura 5-50: Electroforesis del ARN obtenido a partir de semillas de *Lepechinia bullata* con diferentes protocolos de extracción.



Electroforesis en gel de agarosa al 1%. En cada carril se sembraron 5 μL del ARN obtenido según el protocolo. Carril 1. Patrones de tamaño de fragmento (pares de bases); carril 2. TRI Reagent®, de Sigma–Aldrich; carril 3. Direct-zol™ RNA miniprep, de Zymo research; carril 4. Aurum™ Total RNA Fatty & Fibrous tissue kit, de Bio-Rad; carril 5. Total RNA isolation from plant tissue or filamentous fungi, de Macherey-Nagel; carril 6. Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro Kit, de Life Technologies.

En la electroforesis (Figura 5-50) puede observarse que el ARN obtenido con el protocolo de las perlas magnéticas (Dynabeads mRNA DIRECT™) presenta un patrón de bandas característico del mARN no degradado (carril 6), además no se observan bandas de contaminación con ADN. Teniendo en cuenta los resultados, se escogió para realizar la síntesis de primera hebra. En los demás carriles (2 – 5) no se observó claramente la integridad del mARN, ya que se presentan solamente bandas tenues por debajo de 250 pares de bases, lo que indica que el mARN puede estar degradado.

A partir del ARN obtenido en el paso anterior y utilizando oligo(dT) como iniciador, se llevó a cabo la síntesis de primera cadena de ADN (cDNA) mediante el sistema comercial *RevertAid™ first strand cDNA Synthesis Kit* de Thermo Scientific, adicionando inhibidor de ARNasas, lo que disminuye el riesgo de degradación del ARN por estas enzimas. Con este paso se obtuvo la cadena molde de ADN a partir de todo el mARN extraído, lo que permitió iniciar el proceso de amplificación de fragmentos con primers específicos, teniendo como base que solamente se estaba trabajando con ARN codificante.

5.3.2 Amplificación de fragmentos de ADN

Trabajar con mARN en lugar de ARN total, evita que los primers específicos se unan a secuencias no codificantes que pudieran hibridarse con estos. Esta característica disminuye la posibilidad de amplificaciones no deseables.

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó utilizando como iniciadores juegos de primers previamente diseñados por Alvarado en un trabajo de *Calopogonium galactoides* (datos no publicados) con base en secuencias reportadas de lectinas vegetales con afinidad por galactosa, N-acetilgalactosamina, manosa o glucosa (Tabla 5-16).

De igual forma, tomando como base parte de la secuencia amino terminal determinada para LSBo-I, la cual corresponde a: (A/V)(K/I)VTSFXYTSFSSSSD(I/L)(T/K)LQ, se diseñaron primers forward degenerados. Para este caso se utilizó un primer reverse universal AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) el primer reverse utilizado fue el proporcionado por el kit de síntesis de primera hebra basado en la cola de poliAdeninas que presenta el mARN (Tabla 5-16).

12 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
 8 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
 de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

Tabla 5-16: Primers utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN proveniente de semillas de *Lepechinia bullata*.

Primers	Especificidad	Primer Forward	Primer Reverse
GmGal	Gal/GalNAc	TTAGATGGCCTCATTGAGCA	ATGGCCACCTCCAACCTTCTC
Cemn	Man/Glc	AAATCCTCCCTGTTCCCTCC	CCGGGATCTCATTGCTCTT
Can	Man/Glc	ATCTCAAAGAATCCTCCCTGTT	GGGATCTCATTGCTCTTCAACTT
Craty	Man/Glc	GCTCATACTATTGTTGCTGTTGAA	AGCATCTGGAAAAAGTCCAAGA
Cym	Man	TTCTTCTTCTGATCTTACTCTTCAA	AAAGTCCAGTAGGCAGTCTTTCCA
Dio	Man/Glc	TGATAGTAGTGAGCAGGGTGAGC	TAAAGACCGTTGTAGCAGAAAAG
Dgf mn	Man/Glc	GGGTGAGCTCATCAATAGCA	CCGGTTGTAGCAGAAAAGACC
Soja	Gal/GalNAc	TTTTACAGATGAGCAGTTTGACC	TACCTCCAACCTCAAGACCAAC
Lam	GalNAc	CTTCGACCCTAATGATACCTCA	CGGTGAACTCCCAATAGTTAAT
LSBo 1	T/Tn	GYNAWNGTNACNWSNTT	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
LSBo 2	T/Tn	GTNACNWSNTTYNNNTAYAC	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
LSBo 3	T/Tn	AWNGTNACNWSNTTYNNNTAYA	GGCCACGCGTCGACTAGTAC

GmGal: *Glycine max*; Cemn: *Canavalia ensiformis*; Can: *Canavalia brasiliensis*; Craty: *Canavalia gladiata*; Cym: *Cymbosema roseum*; Dio y Dgf mn: *Dioclea grandiflora*; Soja: *Sophora japónica*; Lam: *Glechoma hederacea-Salvia miltiorrhiza*; LSBo: Lectina de *Salvia bogotensis*.

El juego de primers Lam, fue diseñado sobre la secuencia de *Salvia miltiorrhiza* (EF593952.1 en GenBank) y de *Glechoma hederacea* (AY130253.1 en GenBank), especies vegetales de la familia Lamiaceae, después de haber obtenido una secuencia consenso mediante alineamiento por T-Coffee, como se muestra en la Figura 5-51.

Figura 5-51: Secuencia consenso obtenida por T-coffee, después del alineamiento de las lectinas de *Salvia miltiorrhiza* y *Glechoma hederacea*.

```

1          10          20          30          40          50
|          |          |          |          |          |
SCNNNNNNNNTCAATYANNNNNNNNNAGCCATGGCCNNNNNNNAAGCTYCY
CCAAAMCCTARTTNNNNNNNNNTCCRYMRYCGYCYTSYTCCTCRYSGYWG
CSAACAYGGYGCKSTCYMAAACKACKYMCTTCNNNNNNNNNNNNNNNNGC
GRYNNGCCGMMTGMYKTSAYCTWYCAAGGCKMCGCCYWYKWCCCKWMSR
YACCWCMTTCMTCCGCTCACCRMYKACWWCSTSRMRMGTCGGYCGKG
TCRTGYACTCGAASCCGSTCMMKTTCTSSSRWGRSGGAAMCAAGTCSAY
TTYRAAACCAMRTRARYTTCAWCATCACS YCCRKCSCCGRYAAAYANNM
KGCCGATGGSSTCGCCTTMTTCATSGYMCCCGTSGGCMCCMCCRYCCCTA
MYGGCKSCRMC GGWGS CAAYTMGGRSTCTTYGAMTCMWMCGGCRWCGGC
RMMKCSRTCTTYGCCGTCRAAKTCGACACCYACGYCAANNCGYGTGGGA
YCCRCYYTRTCSCCACATCGGSATCRACRTCRRCTCYMGKGYRNCWGYA
RCACRNAMGYRKRTSGACRRCTCCRTMMWCKGGSARSASGTGACTCTGY
SATMAACTACGWYGRAGCCRMKARRATSATMACYGYARAGYYMMSGYYG
GSTYRANNARACRTTNYGASSTYAGCYATRAGTWSGATTTGAGCRMWTT
STTRMWRAGMAGGTTTCARGTCGGRCTMTTCMGCTCCACSGGAMMAMACRT
YGCYMYYCAYGACATYRWCTMKTGGKAKTTCACSGCCAMCATGRTSYNNN
NNNNNNASTCMRASKCCGTYGNRMGGMCMGGAACKMGYRRCYKGMWC
AWYWTWMS TYARKTTRWGKGMWTTWRTKRYRTGTGYRTGKANGTRTGCAT
GTRTNNNNNNNNNNGTCNNNNNNNNNGCANNNNNNNNNNNAMTMAATA
AGGACTARNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNGCRATYRAMNNNNNNNNNNNNNNNN

```

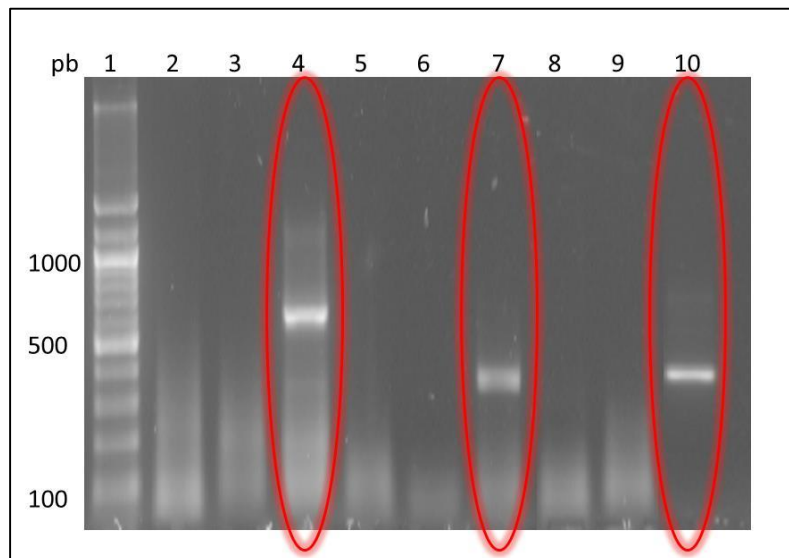
Según el código de ambigüedad de nucleótidos, cada letra que aparece en la secuencia corresponde a: **A**: adenina, **G**: guanina, **C**: citosina, **T**: timina, **M**: A o C, **R**: A o G, **W**: A o T, **S**: C o G, **Y**: C o T, **K**: G o T, **V**: A o C o G, **H**: A o C o T, **D**: A o G o T, **B**: C o G o T, **N**: Desconocido (resaltado en color amarillo).

Con la anterior secuencia se realizó un BLAST (Altschul et al., 1990) contra diferentes proteínas vegetales, en donde se encontraron dos secuencias de lectinas reportadas para Leguminosas: la lectina de semillas de *Styphnlobium japonicum*, específica por β GalNAc,

y la lectina de *Platypodium elegans*, específica por Man/Glc, lo que podría sugerir una vez más que las lectinas de Lamiácea utilizadas como molde presentan similitud con algunas lectinas de Leguminosa. Los primers degenerados diseñados, tuvieron una temperatura de melting (T_m) calculada de 58.21°C para el forward y de 57.22°C para el reverse.

La PCR con todos los pares de primers se realizó siguiendo las condiciones descritas previamente en la metodología. Los primers diseñados sobre las secuencias de *Canavalia brasiliensis* (Can), *Canavalia gladiata* (Craty) y *Dioclea grandiflora* (Dgf mn) mostraron fragmentos amplificados de aproximadamente 700 pb para el primer juego de primers y 400 pb para el segundo y el tercero (figura 5-52). Sin embargo, estos tamaños estuvieron por debajo del esperado, que correspondía aproximadamente a 1000 pb tomando como base el número de aminoácidos reportado para LSBo-I (347), asumiendo que las dos lectinas (LSBo-I y LLb-I) tuvieran un tamaño similar. La temperatura en la que se vio un fragmento más definido fue en 58°C para los tres casos (Can, Craty y Dgf mn).

Figura 5-52: Electroforesis de los fragmentos de ADN de *Lepechinia bullata* amplificados con los distintos juegos de primers ensayados.

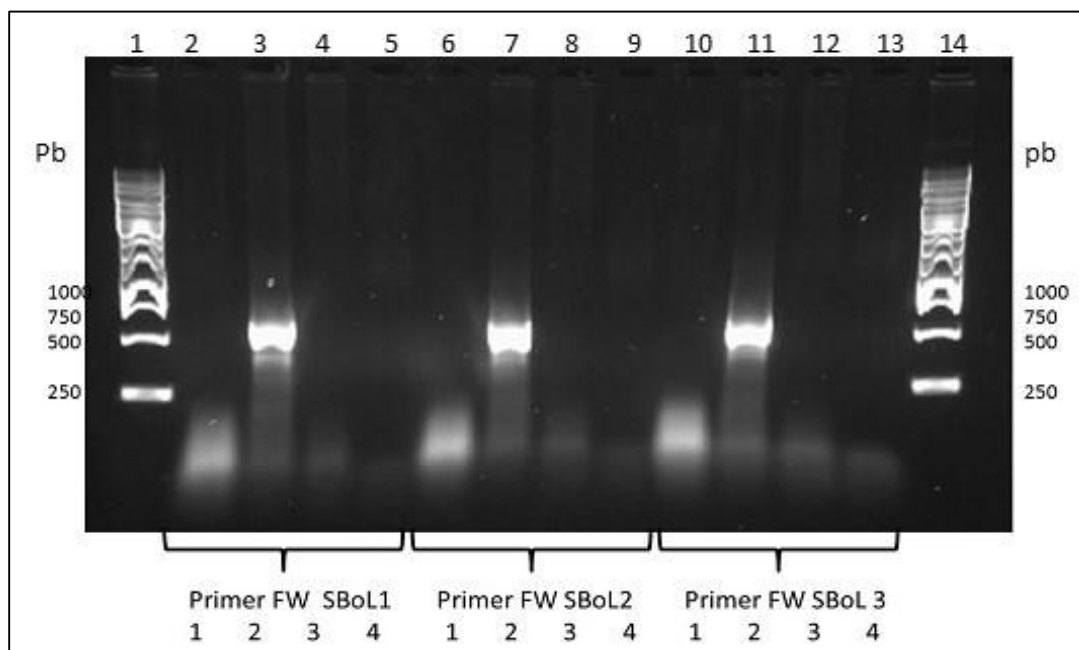


Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En cada carril se sembraron 9 μ L del amplificado obtenido con los juegos de primers. Carril 1. Patrones de tamaño de fragmento (pares de bases); carril 2. Lam; carril 3. Soja; carril 4. Can; carril 5. Cym; carril 6. Dio; carril 7. Craty; carril 8. GmGal; carril 9. Cemn; carril 10. Dgf mn.

Los fragmentos obtenidos con los iniciadores Can, Craty y Dgf mn se reamplificaron con sus correspondientes primers y con las mismas condiciones de PCR, para obtener bandas más limpias que permitieran su purificación.

Para los tres juegos de primers diseñados sobre la secuencia de LSBo-I se utilizó una temperatura de hibridación de 45°C, mostrando un fragmento amplificado entre 500 y 750 pb (Figura 5-53).

Figura 5-53: Electroforesis de los fragmentos de ADN de *Lepechinia bullata* amplificados con los primers diseñados sobre el amino terminal de LSBo-I.

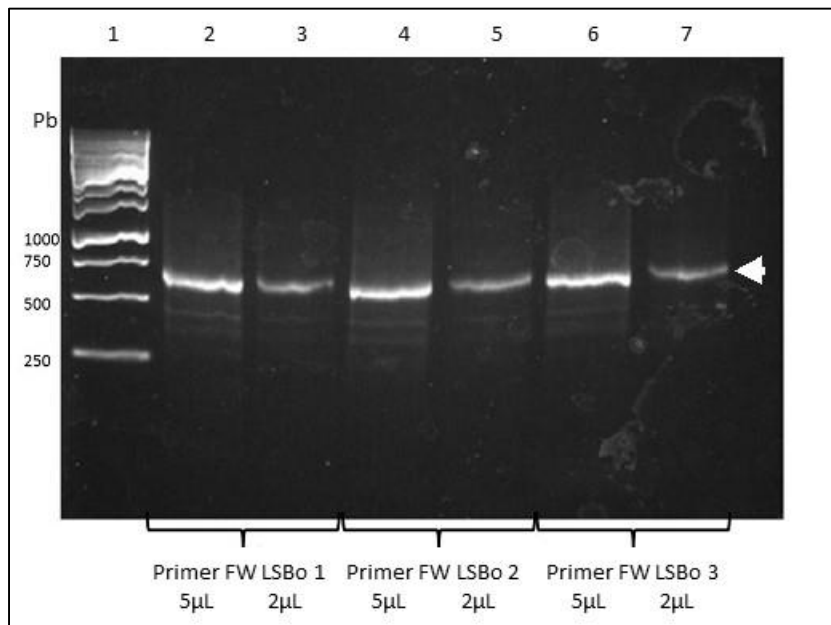


Electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. Carril 1 y 14. Patrones de tamaño de fragmento (pares de bases). En los demás carriles se sembraron 9 μ L del amplificado obtenido con los primers LSBo 1 (carriles 2 al 5), LSBo 2 (carriles 6 al 9) o LSBo 3 (carriles 10 al 13), partiendo de tres métodos diferentes de extracción de ARN y una muestra control negativo. Condición 1: TRI Reagent®, de Sigma-Aldrich (carriles 2, 6 y 10); Condición 2: Dynabeads mRNA DIRECT™ (carriles 3, 7 y 11); Condición 3: Aurum™ Total RNA Fatty & Fibrous tissue (carriles 4, 8 y 12); Condición 4: Control negativo (carriles 5, 9 y 13).

Con los resultados obtenidos se confirmó que el mejor protocolo para la extracción de ARN fue Dynabeads mRNA DIRECT™, muestras a partir de las cuales fue posible obtener un fragmento de ADN amplificado utilizando cualquiera de los tres primers diseñados sobre la secuencia de LSBo.

Para obtener bandas más definidas que permitieran su purificación, se procedió a realizar una reamplificación en las mismas condiciones que la anterior PCR, utilizando como muestra cada amplificado; este proceso mejoró la definición de las bandas en el gel (Figura 5-54).

Figura 5-54: Electroforesis de los fragmentos de ADN de *Lepechinia bullata* reamplificados con los primers diseñados sobre el amino terminal de LSBo-I.



Electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. Carril 1. Patrones de tamaño de fragmento (pares de bases). Primer LSBo 1: carriles 2 y 3 (5 µL y 2 µL respectivamente); primer LSBo 2: carriles 4 y 5 (5 µL y 2 µL respectivamente); primer LSBo 3: carriles 6 y 7 (5 µL y 2 µL respectivamente).

Con el proceso de reamplificación se obtuvieron bandas adecuadas para purificar y secuenciar posteriormente, evidenciando que los primers LSBo generaron fragmentos amplificados de ADN de *Lepechinia bullata* con un tamaño cercano a las 700 pb, que en el caso de ser la lectina de interés tendría alrededor de 230 residuos de aminoácido, lo que concordaría con el tamaño del monómero de algunas lectinas vegetales reportadas en la familia Leguminosa.

Con respecto a los primers Lam elaborados sobre las secuencias de Lamiáceas no presentaron ningún amplificado, debido probablemente a que su diseño se realizó sobre una secuencia altamente degenerada, que adicionalmente no correspondía específicamente a la lectina de interés.

Con las demás secuencias iniciadoras tampoco se evidenciaron amplificadas en ninguna de las temperaturas ensayadas (entre 57 y 62°C, con variaciones de 0.5°C).

5.3.3 Secuenciación del ADN amplificado

Los fragmentos reamplificados se purificaron cortando las bandas directamente del gel de agarosa y eluyendo los productos en agua libre de nucleasas. Las muestras fueron preparadas en un volumen de 20 µL, en concentración aproximada de 100 ng/µL, y etiquetadas como LLb-Can, LLb-Craty, LLb-Dgf mn y LLb-LSBo para ser enviadas a secuenciación.

El resultado obtenido a partir del fragmento amplificado con los primers “Can” arrojó una secuencia de 433 pb (>00LD3) (Figura 5-55). La conseguida por los primers “Craty” se muestra en la figura 5-56 con 332 pb (>00LD6), la lograda con “Dgf mn” mostró 337 pb (>00LD9) (Figura 5-57) y la amplificada con “LSBo” 630 pb (Figura 5-58).

Figura 5-55: Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “Can”, diseñados a partir de la lectina de *Canavalia brasiliensis*.

```
>00LD3 (433)
TTTCCCTTTGGAAATGCCACCTTAATAAGGAYCKAARTCCTATAATGTTATCCCATGCTA
ATGTATCSARAGCGYACATTTGCTTGGAGACTCTAATTTCTTCAAAGTAACAGCGCCCGA
TGCTCGACCCGGCCAWTTAAGACCTGGAKCGCATCGCCGGCAGAAGGGACRAGACGACCG
GTGCATCCGTACGGCGGACCAGCCGAACCAACCCAAAKTCCAACACTACSAGCTTTTTATYT
GTAACACTTAAATATACGCTATTGGATCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAAAYTT
GCCCTCYATGGATCCTCGTTAAGGGATTTARATTGTATCATTCCAATTACWACTCTAKA
GCYCGGTATTGTATTTATTGTCATACCTCCCCGTGTYAKGATTGGGTAATTTGCGCGCCT
GCTGCCTTCCTTG
```

Figura 5-56: Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “Craty”, diseñados a partir de la lectina de *Canavalia gladiata*.

```
>00LD6 (332)
ASKSMTGGRMATTTGGGTTGGGTGCGCCGGTCCGCCTTTCCGGTGTGCACCGGTCGTCTCG
TCCCTTCTGCCGGCGATGCGCTCCTGGTCTTAACCTGGCCGGGTCGTGCCTCCGGCGCTGT
TACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGGATACATTAGCATGGGA
TAACATTATAGGATTTCCGGTCCTATTACGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAACA
GGGACAGCCGTGGGCATTTCGTATTTATAGTCAGAGGTGAAATTCTTGGACTTTTTCCAG
ATGCTAACCGTCGACCAGGAGCCCTCCCCCCC
```

- 13 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
4 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*
-

Figura 5-57: Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “Dgfmn”, diseñados a partir de la lectina de *Dioclea grandiflora*.

```
>00ML9 (337)
GACGGATACTCGACAATCCCAGTACAAATCGATTGACTTTGAGACACTAACTT
TGGGCTGCCTACCACCTACCTTTTAAGGTTTTGCTATTATCGTTATTTTCTACTTACGTC
TAACTATGCTTACGTCTAAAGATTAATGTTTGTGTTTACAACATGCTTGGCAAATTGTGC
CTAAGTTAGATATATACCATACGAAAGCAAATAATGTGCTCTTTTCATGTTTAGATAAAA
GTAATATTTTCCATTAGCTGCTTCTTTTTGTGATTAATACTATTATGATTACAGTCTTAC
ATAACTTATAAGTTGTGGTCTTTCTGCTACAACCGGA
```

Figura 5-58: Secuencia del fragmento amplificado con los primers denominados “LSBo3”, diseñados a partir de la lectina de *Salvia bogotensis*.

```
>11719450.seq - ID: Lb13-T7 on 2013/7/1-19:45:38
automatically edited with PhredPhrap, start with base no.: 18
Internal Params: Window size: 20, Goodqual: 19, Badqual: 10,
Minseq length: 50, nbadelimit: 1
cggccgcnatggCGGCCCGCGGgaatTCGATTGGCcACGCGT
CGACTaGTACAACCCACGCGCCGGgaGGTTCTCCACCT
TCAATAGCTTCAATCTCCCCATCCTCCGCTTCCTCCA
ACTCAGCGCCGCCAGAGGAGTCTTCAAAGGAAGGC
GATATTCTCACCACACTGGTACGCCAACGCCACAAC
CTAATCTACGCCACGCGCGGCGAGTCCCGGGTGCAG
ATAGTGAACCACCACGGCCAGGCGGTGTTGACGGG
CAGCTCAGGGAGGGGCAGGTGTTGGTGGTGCCACAG
AACTTCGCGGTGGTGAAGCAGGCCGGAGAGCAGGGG
TTCGAGTGGGTGGCCTTCAACACCAACGACAACGCC
GCCATCAACACCTTGAGCGGCCGCACCTCCGCCATCA
GAGGGCTGCCGGTGGACGTCGTCGCCAACGCCTACC
AAATCTCGAGGGAGGAGGCGGAGAGGCTCAAGTTTT
CGCGGCGGGAGACAGTCTTTTCAGCGGAAGTGGAA
GATCTanaGCTGCTTCTGCCTGAAATAAATGTAAATTaa
```

Con cada una de las anteriores secuencias se realizó un BLAST (megablast) para identificar cadenas nucleotídicas similares que ya estuvieran reportadas, sin embargo se encontró que los fragmentos amplificados con “Can” y “Craty” presentaron identidad únicamente con secuencias relacionadas con el gen de ARN ribosomal 18 S (Anexos O y P). Por su parte, la secuencia obtenida con “LSBo” mostró identidad con proteínas de reserva de semillas tipo globulina, pero ninguna relacionada con lectinas.

Con respecto al fragmento amplificado con “Dgf mn”, fue necesario correr un BLAST de secuencias no contiguas con las condiciones por defecto (megablast discontinuo), debido a que no se obtuvo ningún resultado al correr el blast de secuencias altamente similares (megablast), observándose en segmentos cortos (máximo de 80 pb), identidad de genes como el de sinaptotagmina, (proteína presente en la neurotransmisión) entre otros (Anexo Q).

Ninguno de los genes que se encontró en el análisis BLAST estuvo relacionado con lectinas, lo que indica que los primers diseñados fueron bastante inespecíficos.

Dada la escasa información relacionada con la estructura de lectinas de Lamiáceas y a los resultados arrojados tras el trabajo con los doce pares de primers, se concluyó que estos ensayos deben continuarse cuando se haya elucidado por lo menos la secuencia amino terminal de la lectina de *Lepechinia bullata*, sobre la cual puedan diseñarse iniciadores específicos para ésta.

Los ensayos realizados permitieron establecer las condiciones adecuadas para la extracción de ARN y la obtención de cADN a partir de semillas de *Lepechinia bullata*, sugiriendo el uso de perlas magnéticas para la extracción del ácido nucleico, y confirmando que es posible extraer ARN a partir de las semillas inmaduras, y que éste tiene la calidad y cantidad suficiente para ser utilizado como molde en la síntesis de primera hebra y posteriormente en la amplificación, lo cual, debe hacerse con primers diseñados específicamente sobre la secuencia de interés con miras a obtener la secuencia codificante de LLb-I.

5.4 Purificación y caracterización de nuevas lectinas en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

5.4.1 Cromatografía de afinidad con diferentes ligandos

Debido a la dificultad en la obtención de la proteína pura y tomando como base resultados previos de Glycoarrays para LLb-I, los cuales fueron discutidos en el apartado 5.1.1 (Vega et al., datos no publicados), la fracción retenida obtenida mediante cromatografía de

intercambio iónico fue pasada a través de columnas de 1 mL con soportes que tenían diferentes ligandos: Galactosa (Gal), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), Fucosa (Fuc) y Manosa (Man) (Figura 5-59). La elución se realizó con 200 mM del azúcar correspondiente, después de haber eluido una fracción con NaCl 1 M para reducir uniones inespecíficas.

Figura 5-59: Columnas para cromatografías de afinidad de las fracciones retenida y no retenida por intercambio iónico, de *Lepechinia bullata*.

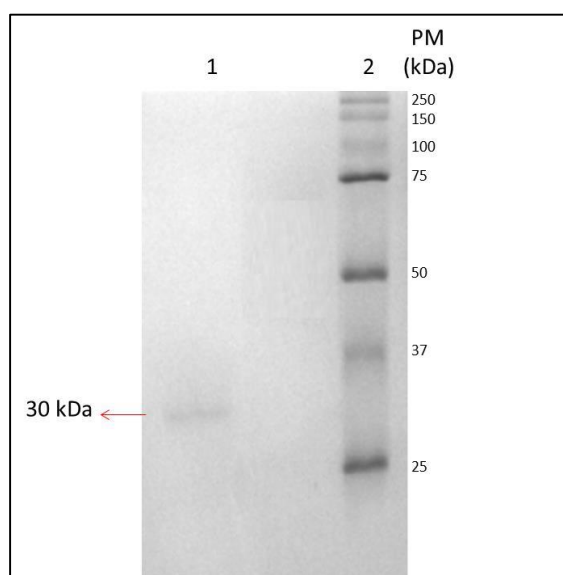


De izquierda a derecha columnas de 1 mL utilizadas para cromatografía de afinidad. Amarilla: manosa (D-Manosa-agarosa), azul: fucosa (α -L-Fucosa-agarosa), verde: n-acetilglucosamina (N-acetil-D-glucosamina-agarosa) o Anaranjada: galactosa (Sepharose 4B).

La fracción retenida de intercambio iónico sobre DEAE presentó retención en la columna de afinidad sobre Manosa-agarosa. Los demás soportes no arrojaron resultados de retención de proteína.

En la figura 5-60 se observa una banda en 30 kDa correspondiente a la proteína retenida sobre afinidad, lo que indica que esta lectina interactúa con manosa pero no reconoce ni el epímero de glucosa ni las otras hexopiranosas ensayadas por cromatografía de afinidad sobre estos ligandos. Este resultado podría sugerir que el grupo OH del carbono 4 es importante para la interacción de la lectina con el azúcar, corroborando observaciones anteriores en el análisis de la estructura.

Figura 5-60: SDS-PAGE de la fracción retenida por cromatografía de afinidad sobre manosa – agarosa para *Lepechinia bullata*.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. Carril 1.5 μ g de la Fracción eluida con manosa 200 mM; carril 2. Patrones de peso molecular.

5.4.2 Purificación de lectinas con reconocimiento por manosa

Con el fin de tener un mejor rendimiento de la proteína, se realizaron otros ensayos de afinidad. En las dos especies, *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*, se utilizó la “Fracción retenida” de la cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE, para obtener la lectina específica de manosa.

- **Cromatografía de afinidad sobre Sephacryl S-200 HR**

El soporte de sephacryl S-200 está compuesto de dextranos entrecruzados con bisacrilamida, el cual, por la presencia de glucosas en su estructura, podría permitir la unión de la lectina.

El perfil cromatográfico obtenido a 280 nm para la lectina II de *Lepechinia bullata* (LLb-II) se muestra en la figura 5-61, y para *Salvia bogotensis*-II (LSBo-II) en la 5-62. Para las dos lectinas se observó una pequeña fracción retenida eluida con α -metil manopiranososa.

Figura 5-61: Cromatografía de afinidad sobre Sephacryl para LLb-II.

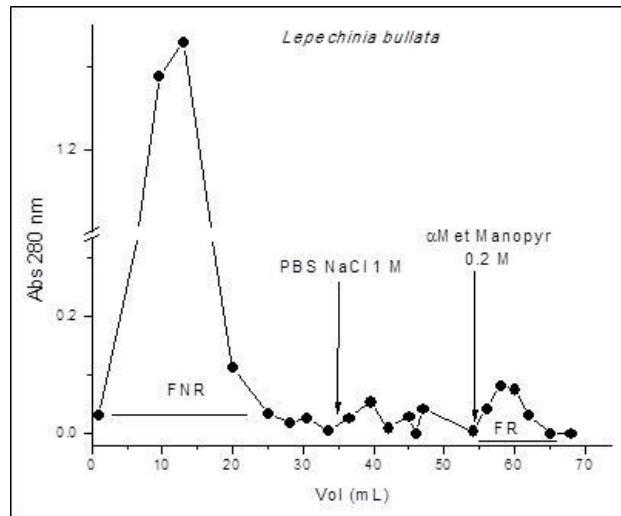
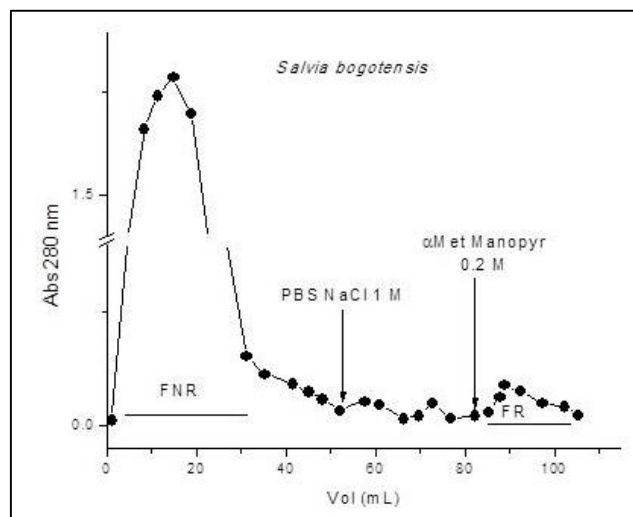


Figura 5-62: Cromatografía de afinidad sobre Sephacryl para LSBo-II.



En cada caso, la fracción retenida se concentró y se equilibró en PBS 1X mediante Centricon® de 10 kDa, para posteriormente obtener su perfil electroforético y probar su capacidad eritroaglutinante (Tabla 5-17).

Tanto LLb-II como LSBo-II mostraron aglutinación sobre eritrocitos Tn utilizando menos de 2 µg de proteína. Con ninguna de las dos especies se evidenció actividad sobre los otros tipos de glóbulos rojos ensayados (A, B, O), aunque previamente los extractos crudos aglutinaron todos los eritrocitos ensayados.

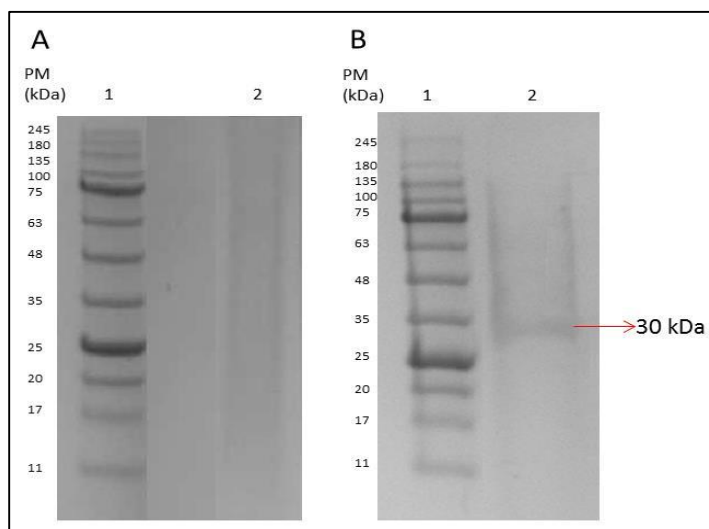
Tabla 5-17: Actividad eritroaglutinante de la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre Sephacryl, para LLb-II y LSBo-II.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (µL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (µg)	Ensayo de Eritroaglutinación				
				A	B	O	T	Tn
LLb-II	0.52	5	2.6	-	-	-	-	+2
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				-	-	-	-	1.3
LSBo-II	0.45	10	4.5	-	-	-	±	+3
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				-	-	-	4.5	1.1

-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte.

Por SDS-PAGE en condiciones reductoras se sembraron 30 µg de cada una de las fracciones retenidas; con la especie *Lepechinia bullata* no se evidenció ninguna señal (Figura 5-63 A), mientras que con la especie *Salvia bogotensis* se observó una banda alrededor de 30 kDa (Figura 5-63 B), similar a la obtenida para *lepechinia bullata* cuando se hizo afinidad sobre manosa-agarosa.

Figura 5-63: SDS-PAGE de LLb-II y LSBo-II obtenidas por cromatografía de afinidad sobre Sephacryl.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. A. *Lepechinia bullata*: Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 30 µg de la lectina obtenida por cromatografía de afinidad sobre Sephacryl. B. *Salvia bogotensis*: Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 30 µg de la lectina obtenida por cromatografía de afinidad sobre Sephacryl.

▪ **Cromatografía de afinidad sobre Manosa - Sepharose 4B**

Previamente, 0.5 mL de soporte fueron sometidos a una corrida en blanco con las condiciones de la cromatografía. Posteriormente se ensayó su funcionalidad sembrando 3.6 mg (500 μ L de solución 7.2 mg/mL) de Con A, lectina que reconoce oligosacáridos que poseen glucosa o manosa (Sumner et al., 1938; Goldstein y Poretz, 2012) y eluyéndola con glucosa 0.2 M. El perfil cromatográfico mostró una fracción no retenida considerablemente mayor que la fracción eluida con glucosa 0.2 M, de la cual se obtuvieron 0.5 mg de Con A (anexo R). Con un 13.8% de retención se realizaron los siguientes posteriores de purificación.

Las fracciones retenidas en intercambio iónico de *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis* fueron purificadas utilizando este soporte; en las figuras 5-64 y 5-65 se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos a 280 nm para cada una de las especies.

Figura 5-64: Cromatografía de afinidad sobre Manosa – Sepharose 4B para LLb-II.

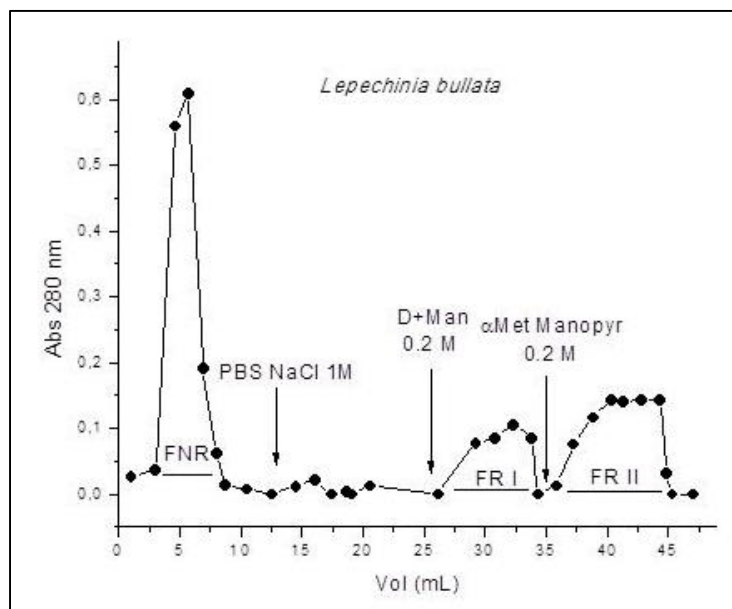
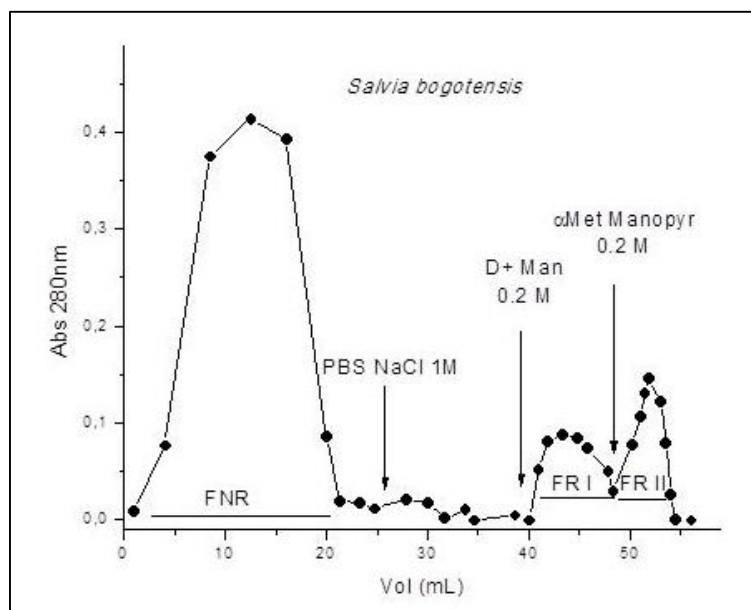


Figura 5-65: Cromatografía de afinidad sobre Manosa – Sepharose 4B para LSBo-II.

Se obtuvieron dos fracciones retenidas que fueron eluidas con manosa y α -metilmanopiranosido; la última de ellas aglutinó los eritrocitos A, T y Tn (Tabla 5-18); con menos de 2 μ g. Una mejor aglutinación fue observada con eritrocitos A, donde en el caso de LSBo-I fueron necesarios 0.3 μ g de lectina y una concentración mínima de 0.02 μ g/ μ L.

Con las fracciones eluidas con manosa no se evidenció aglutinación, aunque es posible asumir que se trata de la misma lectina pero que interactúa fuertemente con la manosa por lo tanto las diálisis no fueron suficientes para retirar el monosacárido, y el sitio activo de la lectina permanece bloqueado para generar su actividad eritroaglutinante (Comunicación personal Dra. Annabelle Varrot, CERMAV-Francia).

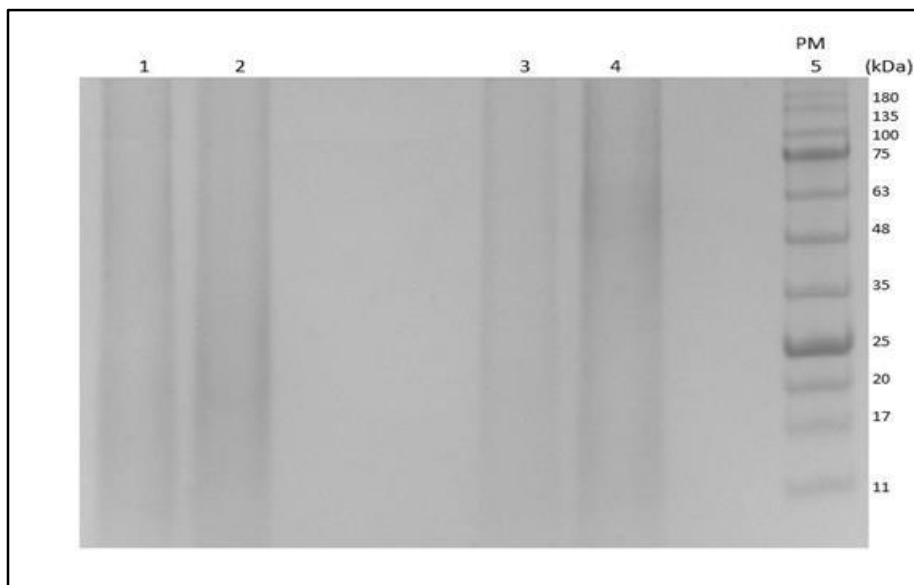
14 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
 2 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
 de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

Tabla 5-18: Actividad eritroaglutinante de las fracciones retenidas en cromatografía de afinidad sobre Manosa – Sepharose 4B, para LLb-II y LSBo-II.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (µL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (µg)	Ensayo de Eritroaglutinación				
				A	B	O	T	Tn
LLb-II eluida con D(+) Man 0.2 M (FR I)	0.25	7	1.8	-	-	-	-	-
LLb-II eluida con α-Met Man 0.2 M (FR II)	0.27	7	1.9	+2	-	-	+2	+1
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				0.9	-	-	0.9	1.9
LSBo-II eluida D(+) Man 0.2 M (FR I)	0.27	7	1.9	-	-	-	-	-
LSBo-II eluida α-Met Man 0.2 M (FR II)	0.20	7	1.4	+3	-	-	+1	+1
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				0.3	-	-	1.4	1.4

-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte.

Figura 5-66: SDS-PAGE de LLb-II y LSBo-II obtenidas por cromatografía de afinidad sobre manosa – Sepharose 4B.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. *Lepechinia bullata*: carril 1. 25 µg de la fracción eluida con D(+)-manosa; carril 2. 25 µg de la fracción eluida con α-metil manopiranosas. *Salvia bogotensis*: carril 3. 25 µg de la fracción eluida con D(+)-manosa; carril 4. 25 µg de la fracción eluida con α- metil manopiranosas. Carril 5. Patrones de peso molecular.

Por PAGE-SDS no se observó un perfil electroforético claro que indicara la presencia de proteína; se presentaron barridos en cada uno de los carriles (figura 5-66) lo que imposibilitó la comparación entre las dos eluciones realizadas con los carbohidratos, para las dos especies vegetales y los datos ya reportados para otras lectinas.

- **Cromatografía de afinidad sobre Con A - Sepharose 4B**

El soporte de afinidad sintetizado tuvo el 63% de acople, es decir, 5.4 g de Con A por cada mL de Sepharose 4B.

Antes de utilizarlo en la purificación de LLb-II y LSBo-II se llevó a cabo un control realizando el perfil de elución NaCl 1% Ca⁺⁺ y Mn⁺⁺, posteriormente glucosa 0.2 M / NaCl 1% y finalmente glicina 50 mM pH 3.0. La absorbancia fue medida a 280 nm, y no se evidenció desprendimiento del ligando (Con A) (Anexo S), por lo tanto, fue posible utilizar este soporte en la purificación de las lectinas.

Posteriormente, 1.0 mL de soporte fue usado para realizar el ensayo de funcionalidad sembrando 7.5 mg (750 µL) de la lectina P4 de *Dioclea lehmanni* (LDL-P4) la cual presenta en su estructura carbohidratos que son reconocidos por Con A, posibilitando su purificación (Pérez et al., 1990). El perfil cromatográfico mostró una fracción no retenida considerablemente mayor que las fracciones retenidas. Sin embargo, en la fracción eluida con glucosa 0.2 M no hubo presencia de proteína, mientras que en la eluida con glicina 50 mM pH 3.0 se obtuvo aproximadamente 1.2 mg de LDL-P4 (Anexo S). Este resultado confirmó la funcionalidad del soporte y permitió continuar con los ensayos de purificación mediante esta estrategia.

Usando la cromatografía de afinidad sobre Con A-Sepharose 4B se separaron glicoproteínas presentes en cada una de la fracciones retenidas de intercambio iónico para *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis* (Micucci y Camps, 1987; Pohleven et al., 2012; Alla y Stine, 2015). Cada una de las muestras fue puesta en NaCl 1% Ca⁺⁺ y Mn⁺⁺ mediante ultrafiltración debido a que Con A requiere de estos iones para ser activa, la columna también se equilibró en esta misma solución. Los perfiles cromatográficos se muestran en las figuras 5-67 y 5-68 respectivamente.

Figura 5-67: Cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B para LLb-II.

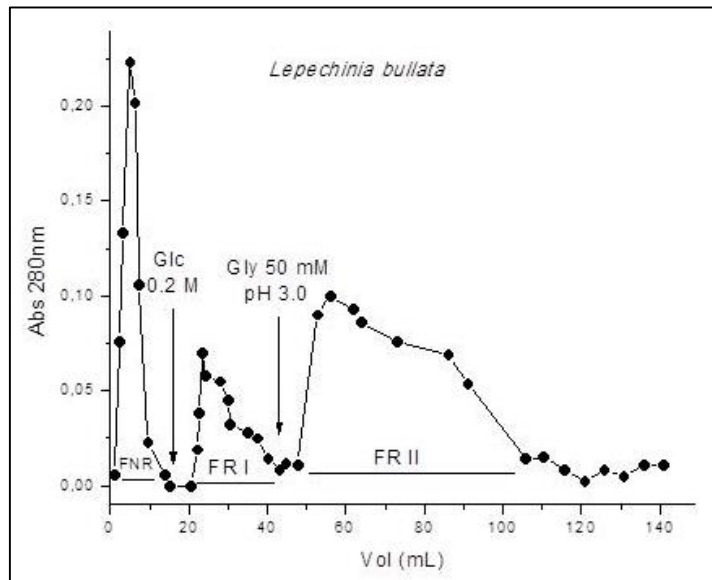
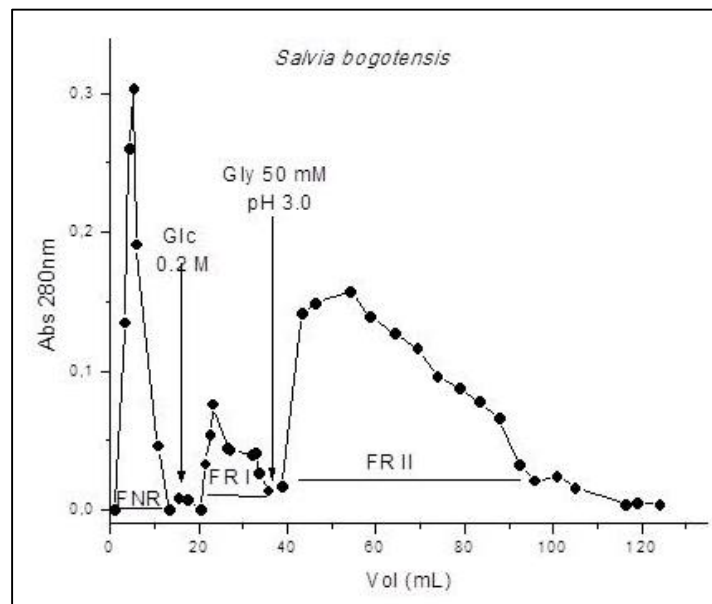


Figura 5-68: Cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B para LSBo-II.



La elución de las proteínas retenidas se realizó en dos pasos; inicialmente con una solución de glucosa 0.2 M, teniendo en cuenta que este carbohidrato es reconocido por Con A, y posteriormente con un buffer glicina-HCl 50 mM pH 3.0, con el fin de eluir todo lo que aún estuviera interactuando con Con A.

La obtención de una fracción a pH 3.0 se debe a un comportamiento característico de lectinas de algunas especies de la tribu *Diocleae*, que presentan un equilibrio dímero – tetrámero dependiente del pH del medio en el que se encuentren (Nagano et al., 2008). Cada uno de los bucles que conforman la cavidad central de la estructura cuaternaria de Con A tiene una orientación determinada para permitir que ciertos aminoácidos interactúen entre ellos estabilizando el tetrámero, por lo que al disminuir drásticamente el pH, se presenta la disociación de subunidades de Con A, afectando su afinidad por las moléculas que reconoce (Olson y Liener, 1967), en este caso por LLb-II y LSBo-II. La fracción eluida con glucosa se denominó fracción retenida I (FR I), y la fracción eluida con glicina se nombró fracción retenida II (FR II). Para las dos especies, la fracción retenida I fue de un volumen considerablemente menor que el de la fracción retenida II eluida con glicina 50 mM pH 3.0.

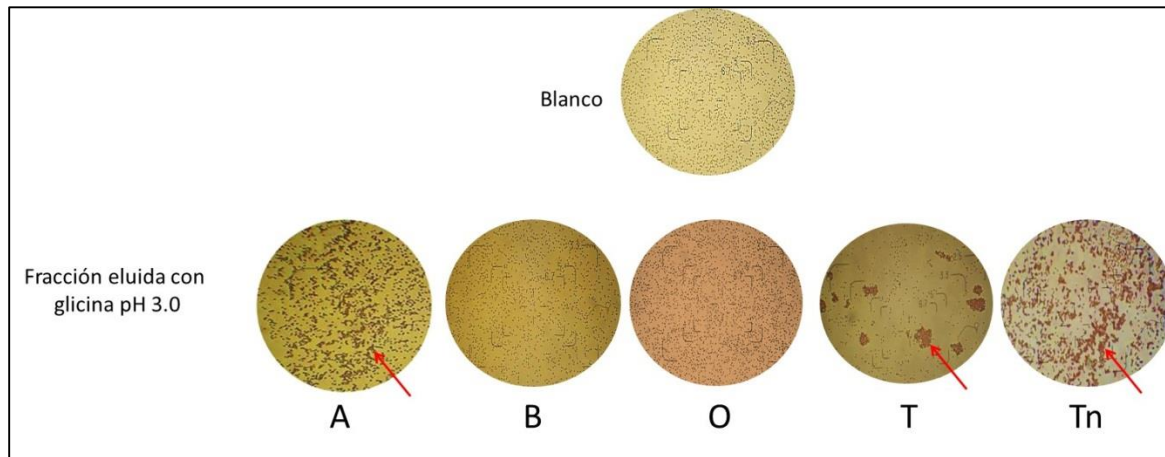
En la tabla 5-19 y las figuras 5-69 y 5-70 se muestran los resultados del ensayo de eritroaglutinación con estas fracciones:

Tabla 5-19: Actividad eritroaglutinante de las fracciones retenidas en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, para LLb-II y LSBo-II.

Muestra	Concentración (mg/mL)	Volumen de muestra usado para el ensayo (µL)	Cantidad total de proteína utilizada en cada pozo (µg)	Ensayo de Eritroaglutinación (Volumen final 10 µL)				
				A	B	O	T	Tn
LLb-II eluida con glucosa 0.2 M 0.2 M (FR I)	0.7	5	3.5	+1	-	-	+3	±
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				3.5	-	-	1.7	3.5
LLb-II eluida con glicina 50 mM pH 3.0 (FR II)	0.86	5	4.3	+2	-	-	+4	+3
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				2.1	-	-	0.5	1.0
LSBo-II eluida con glucosa 0.2M (FR I)	1.0	5	5.0	+2	-	-	+3	+3
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				2.5	-	-	1.2	1.2
LSBo-II eluida con glicina 50 mM pH 3.0 (FR II)	0.68	5	3.4	+2	-	-	+3	+4
Mínima cantidad (µg) de proteína con la que se observó aglutinación				1.7	-	-	0.8	0.4

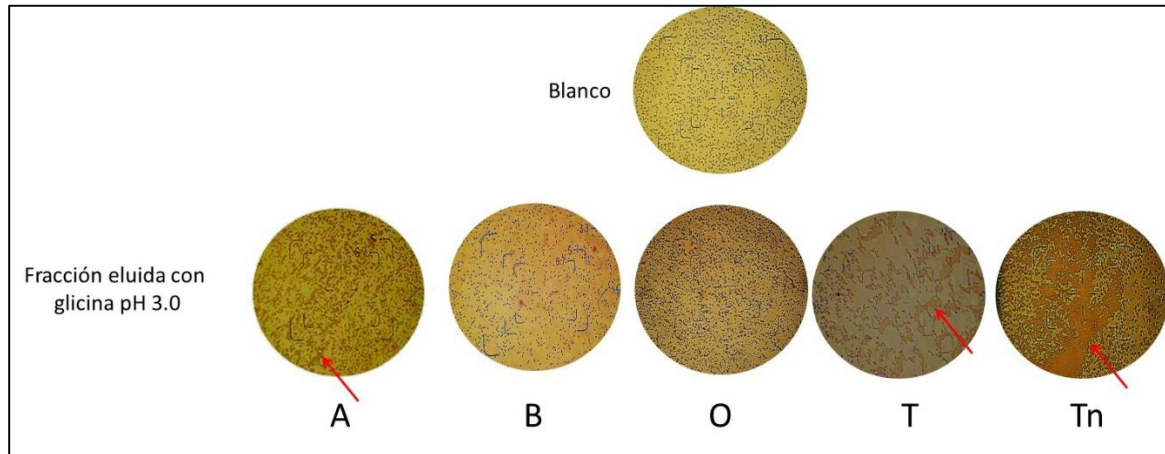
-: Ausencia de aglutinación, +1: Aglutinación débil, +2: Aglutinación media, +3: Aglutinación fuerte, +4: Aglutinación total.

Figura 5-69: Eritroaglutinación de la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, para LLb-II.



Ensayo de actividad aglutinante observado al microscopio con un objetivo 10X. Realizado con eritrocitos humanos del sistema ABO y con eritrocitos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo.

Figura 5-70: Eritroaglutinación de la fracción retenida en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, para la lectina de LSBo-II.



Ensayo de actividad aglutinante observado al microscopio con un objetivo 10X. Realizado con eritrocitos humanos del sistema ABO y con eritrocitos tratados enzimáticamente para exponer los determinantes T y Tn. Las flechas señalan algunos aglutinados observados en el ensayo.

Para las dos especies de Lamiáceas se observó el mismo comportamiento en el ensayo de aglutinación, mostrando que tanto la fracción eluida con glucosa como la eluida con glicina pH 3.0, aglutinaron eritrocitos A, T y Tn, pero la segunda fracción mostró una mejor actividad; la cantidad de proteína para generar aglutinación fue menor (del orden de 0.5 -

2 μg) que la requerida en la fracción eluida con glucosa (1.2 - 3.5 μg) (tabla 5-19). Se podría estar presentando una diferencia en la afinidad de la unión entre la con A y los oligosacáridos presentes en las lectinas de LLb-II y/o LSBo-II. Las fracciones no retenidas presentaron actividad aglutinante con una cantidad de proteína mayor, en este caso no toda la lectina se retuvo en la columna. Lo que indica que se excedió la capacidad de retención; se sembraron 30 mg de proteína total que venían de las fracciones retenidas del intercambio iónico.

En estudios previos Bird y Wingham (1981, 1982), reportaron la presencia de lectinas con actividad aglutinante sobre eritrocitos A, T y Tn en extractos crudos de varias especies de Lamiáceas: *Aegiphila cuatrecasana*, *Hyptis pectinata*, *Hyptis suaveolens* (variedad *Mollissima*), *Ocimum basilicum*, *Ocimum campechianum*, *Salvia horminum*, *Salvia amethystina* (subespecie *Amethystina*), *Salvia aratocensis* (subespecie *Suratensis*) y *Satureja montana*, entre otras. Ninguna de las lectinas presentes en las especies previamente mencionadas se han purificado ni caracterizado bioquímicamente a la fecha.

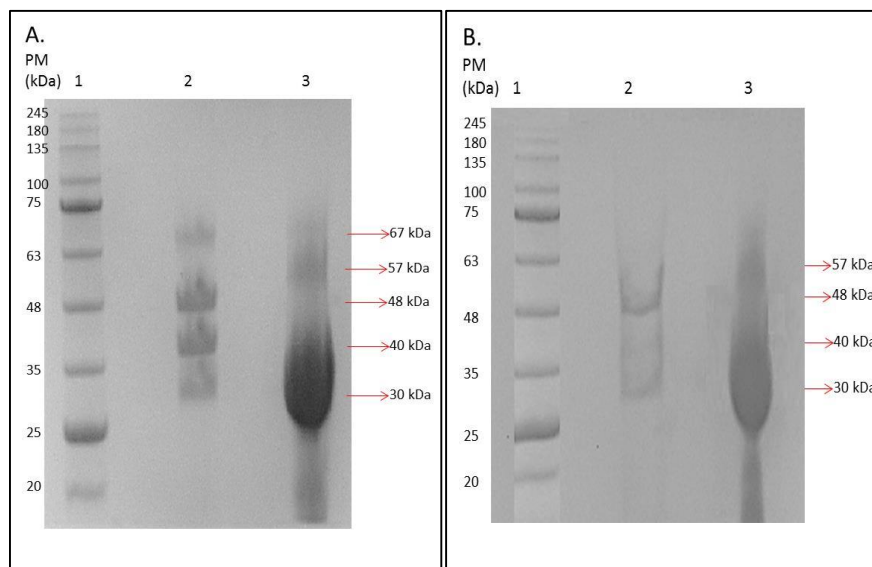
Una de las lectinas con un comportamiento similar de aglutinación, fue aislada de la *Galactia lindenii* (LGL-II), ésta fue aislada sobre sephacryl S-200 y aglutinó eritrocitos A+ y B+ (mínima cantidad de lectina para ver aglutinación 0.625 μg); además fue inhibida con una solución de D-Manosa 150 mM, 18.5 mM de p-Nitrofenil-N-acetil- β -D-galactosamina y 9.5 p-Nitrofenil- β -D-manopiranososa (Quintero, 2014). Las lectinas tipo II de *Dioclea lehmanni* y *Dioclea sericea* también aglutinaron eritrocitos humanos; en este último caso aglutinó mejor los eritrocitos A+ y B+ (Pérez G., 1998; Sierra y Pérez, 1999). Es importante mencionar que la mayoría de las lectinas que reconocen Man/Glc, como concanavalina A, tienen mayor especificidad sobre eritrocitos de conejo (Goldstein et al., 1986); sin embargo, los eritrocitos de conejo en muchos casos se autoaglutinan y por lo tanto es difícil evaluar la actividad.

Por otro lado, en algunas lectinas de la familia RIP (proteínas inactivadoras del ribosoma) se ha reportado el reconocimiento por parte de una misma lectina, de una variedad de carbohidratos entre los que se cuentan N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, galactosa y manosa (Nagano, 2007). Un ejemplo de estas proteínas es la Eutirucallin, una lectina tipo RIP-2 extraída del látex de *Euphorbia tirucalli* que tiene subunidades de 32 kDa

y reconocimiento por α -lactosa > N-acetilgalactosamina > N-acetilglucosamina > D-manosa (Santana et al., 2014). LLb-II y LSBo-II podrían estar presentando un comportamiento similar al mencionado en las anteriores lectinas, sin embargo, para tener certeza de la especificidad de reconocimiento es necesario realizar estudios de inhibición de la actividad. Igualmente, para determinar cómo es la interacción en el sitio de unión, debe llevarse a cabo estudios enfocados a identificar su estructura primaria y tridimensional.

Por SDS-PAGE (Figura 5-71) se observó que la elución en dos pasos realizada para purificar estas lectinas permitió separar otras glicoproteínas que estaban presentes en la muestra, aparentemente dejando la lectina casi como única especie en la fracción eluida con glicina pH 3.0 (banda 30 kDa). Este comportamiento se evidenció para *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*.

Figura 5-71: SDS-PAGE de LLb-II y LSBo-II obtenidas por cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5% denaturante y reductora. A. *Lepechinia bullata*: Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 50 μ g de la fracción eluida con glucosa 0.2 M; carril 3. 50 μ g de la fracción eluida con glicina 50 mM pH 3. B. *Salvia bogotensis*: Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. 35 μ g de la fracción eluida con glucosa 0.2 M; carril 3. 50 μ g de la fracción eluida con glicina 50 mM pH 3.

El perfil electroforético de las dos especies es muy similar, permitiendo ver la diferencia entre las bandas presentes en cada una de las fracciones eluidas con glucosa y el buffer

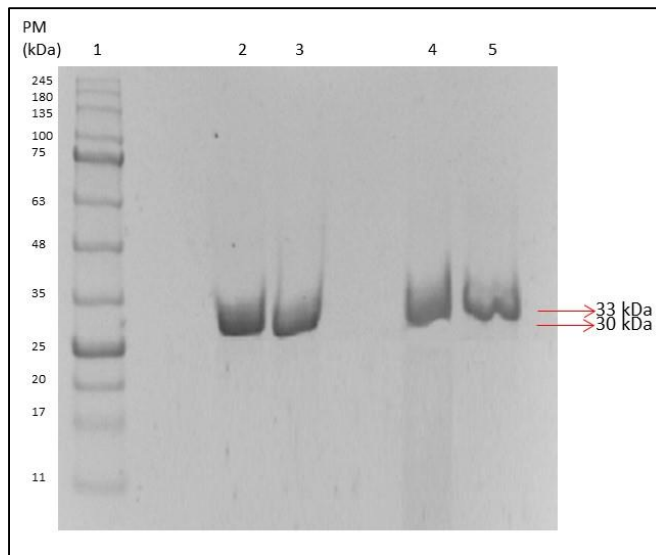
de glicina. Con la cantidad de proteína sembrada, se evidenció en la fracción obtenida a pH= 3,0 una banda alrededor de los 30 kDa, que correspondería al monómero de LLb-II y de LSBo-II, y otra banda menos intensa alrededor de los 57 kDa, que podría ser la forma dimérica. En la fracción eluida con glucosa se observó también una banda alrededor de los 30 kDa que puede corresponder a la misma lectina, sugiriendo que una pequeña cantidad de ésta se eluyó con glucosa; razón por la cual esa fracción también aglutina los eritrocitos.

Algunas lectinas de Leguminosa con afinidad por Man/Glc presentan un peso molecular aparente de 30 kDa en SDS – PAGE (Cavada et al., 2006; Quintero, 2014). En las dos especies de este estudio (*Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*), la banda alrededor de 30 kDa también se observó en las fracciones obtenidas de las cromatografías de afinidad sobre manosa-agarosa y sephacryl S-200.

Con el fin de evaluar la presencia e interacción de las subunidades en LLb-II y LSBo-II la lectina, se corrieron 5 µg de cada una de las fracciones en una SDS–PAGE Tris–Gly 12.5% en presencia y ausencia de DTT como agente reductor, y sometiendo o no las muestras a calentamiento previo (Figuras 5-72 y 5-73).

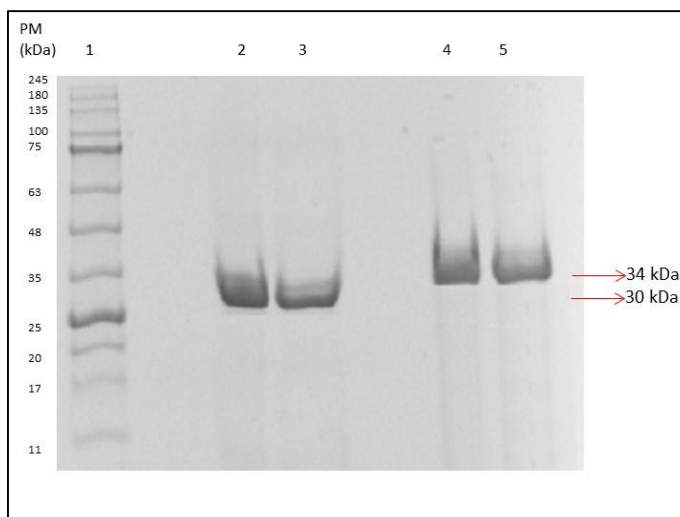
Cinco (5) µg de proteína total fueron suficientes para observar bandas bien definidas en las condiciones establecidas. Por lo general, estas proteínas se disocian fácilmente en condiciones denaturantes. El calentamiento no es un factor importante para su disociación. En condiciones reductoras y no reductoras hay una clara diferencia en la migración de la proteína, lo que indica que probablemente tiene puentes disulfuro intracatenarios que - en condiciones no reductoras- hacen que la proteína migre menos en el gel por no encontrarse completamente desplegada.

Figura 5-72: SDS-PAGE de LLb-II eluida con Gly 50 mM pH 3.0 en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, sometida a diferentes condiciones reductoras.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5%. En cada carril se sembraron 5 μ g de LLb-II y se sometió la muestra a diferentes condiciones reductoras. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. DTT 1 M y calentamiento a 100°C durante 10 minutos; carril 3. DTT 1 M sin calentamiento; carril 4. Calentamiento a 100°C durante 10 minutos sin adicionar DTT; carril 5. Sin calentamiento ni adición de DTT.

Figura 5-73: SDS-PAGE de LSBo-II eluida con Gly 50 mM pH 3.0 en cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B, sometida a diferentes condiciones reductoras.



SDS-PAGE Tris-Gly 12.5%. En cada carril se sembraron 5 μ g de LSBo-II obtenida por cromatografía de afinidad sobre Con A-Sepharose 4B y se sometió la muestra a diferentes condiciones reductoras. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2. DTT 1 M y calentamiento a 100°C durante 10 minutos; carril 3. DTT 1 M sin calentamiento; carril 4. Calentamiento a 100°C durante 10 minutos sin adicionar DTT; carril 5. Sin calentamiento ni adición de DTT.

Las características moleculares determinadas hasta el momento para las lectinas LLb-II y LSBo-II permiten establecer que hay un comportamiento similar con lectinas de la familia Leguminosae y más específicamente con las presentes en la tribu *Diocleae*, con afinidad por Man/Glc (Cavada et al., 2006). En forma breve, estas lectinas tienen un peso molecular aparente de 30 kDa en SDS – PAGE y sus monómeros están unidos por interacciones débiles generando dímeros y/o tetrámeros (dímeros de dímeros). La formación de estas estructuras cuaternarias depende del pH del medio en el que se encuentran. En algunas lectinas de Leguminosae con afinidad por Man/Glc, el pH del medio hace que sus moléculas se encuentren en diferentes estados de agregación debido a la interacción ejercida por aminoácidos presentes en las diferentes subunidades. Para Con A por ejemplo, el peso del monómero es de 25.5 kDa; a pH 5.5 aparece como un dímero y en un pH superior a 7.0 se observa como un tetrámero (Seneer y Teller, 1981). Las lectinas de LLb-II y LSBo-II, son eluidas a pH 3.0, condición que podría afectar la interacción de subunidades impidiendo observar su estructuras de mayor peso molecular por PAGE, tal como ocurre en las lectinas de Leguminosae que presentan el equilibrio dímero – tétramero mediado por pH, comportamiento reportado en varias especies de la tribu *Diocleae* (Nagano et al., 2008).

Otros estudios han mostrado que estas lectinas presentan tres bandas características correspondientes a la cadena alfa (α) (alrededor de 30 kDa), la cadena beta (β) (alrededor de 16.5 kDa) y la cadena gamma (γ) (alrededor de 13.4 kDa); éstas presentan modificaciones postraduccionales (Herman et al., 1985; Bowles et al., 1986) donde la subunidad α experimenta hidrólisis en condiciones reductoras a dos subunidades β y γ (Moreira et al., 1987; Melgarejo y Pérez, 1997; Pérez G., 1998).

Con las lectinas LSbo-II y LLb-II, no se observaron las bandas β y γ . Este comportamiento también se reportó entre algunas lectinas Man/Glc de la misma tribu. En la lectina de *Galactia Lindenii* por ejemplo, la subunidad alfa no se disoció fácilmente y fueron necesarias condiciones más drásticas de reducción (Quintero, 2014). En la electroforesis para la lectina de *Cratylia mollis* tampoco fueron evidentes las subunidades β y γ (Correia y Coelho, 1995) mientras que en *Cratylia floribunda* se evidenció la presencia de dos bandas para la cadena β (16 y 18 kDa) y de una banda para la γ (12-13 kDa) (Grangeiro et al., 1997). En las lectinas Man/Glc de los géneros *Dioclea*, *Canavalia* y *Cymbosema* las

subunidades β y γ se observan fácilmente ya que están en una gran proporción con respecto a la cadena α (Moreira et al., 1983; Cavada et al., 2006; Martínez P, 2009).

Para evaluar cómo es la asociación de subunidades de LLb-II y LSBo-II en condiciones nativas, es necesario realizar un estudio detallado del peso molecular de estas lectinas bajo diferentes condiciones de pH.

El comportamiento electroforético de las lectinas tipo I y II encontradas en las especies de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*, indica que son dos lectinas que constituyen grupos bien diferenciados. Con este trabajo es la primera vez que se reporta la presencia de la segunda lectina Man/Glc dentro de la familia de las Lamiaceas.

Los procesos de extracción y purificación de estas lectinas permitieron obtener a partir 50 g de semillas de *Lepechinia bullata* o *Salvia bogotensis* 16.2 mg de LLb-II y 14.5 mg de LSBo-II. Por cada gramo de proteína total extraída se obtuvieron 2.6 mg y 2.26 mg respectivamente, lo que significa un rendimiento del 0.2% sobre el total de proteína extraída en cada caso (Tabla 5-20). La cromatografía de afinidad sobre concanavalina A fue una buena estrategia para el aislamiento de glicoconjugados, como lectinas de origen vegetal que no son de fácil purificación (Osterne et al., 2014). Los resultados de cuantificación sugieren que la lectina tipo II está en mayor proporción que la de tipo I, lo que podría estar relacionado con una diferencia en la expresión de cada una de ellas, por lo tanto debe existir una razón fisiológica que lleve a que una de las dos se encuentre en una proporción diferente en las semillas.

Tabla 5-20: Cantidad de LLb-II y LSBo-II purificada a partir de 50 g de semillas

Lectina	Cantidad de lectina obtenida por cada 50 g de semilla	Cantidad de lectina obtenida por 1 g de proteína total	Porcentaje de lectina con respecto a la proteína total
LLb-II	16.2 mg	2.62 mg	0.26 %
LSBo-II	14.5 mg	2.26 mg	0.22 %

Existen otras especies vegetales que presentan lectinas con reconocimiento por manosa, tal es el caso de *Galanthus nivalis*, de la familia *Amaryllidaceae* (Van Damme et al., 1987)

y *Lens culinaris*, *Vicia faba* y *Pisum sativa* de la familia Leguminosae (Debray et al., 1981), entre otras.

Las lectinas con reconocimiento Man/Glc, presentan una gran homología estructural pero diferencia en su actividad biológica. Entre las funciones que se les ha atribuido está la estimulación en la producción de citoquinas, actividad tóxica frente a plagas, uso como mitógenos para la diferenciación de linfocitos y en estudios citoquímicos e histoquímicos, entre otros (Cavada et al., 2001; Nagano, 2007; André et al., 2015; Syed et al., 2016).

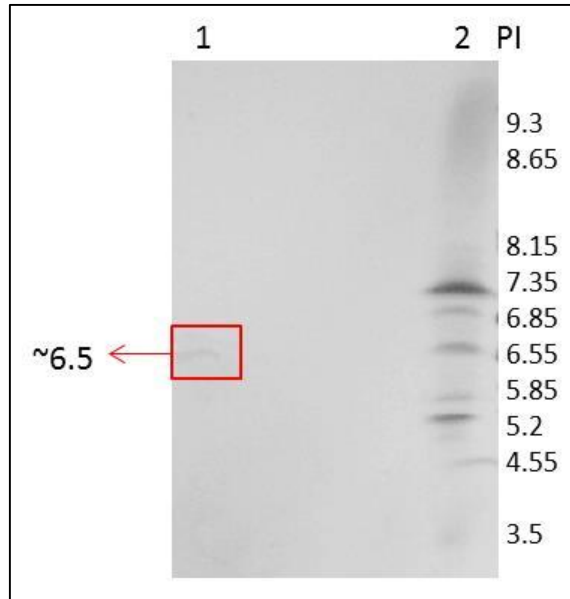
En 2004 se reportó actividad mitogénica en la lectina de *Cratylia mollis* sobre los linfocitos humanos (Maciel et al., 2004); esta lectina presentó reconocimiento sobre Man/Glc, y es estructuralmente similar a la lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) (Tavares et al., 1996). Por otra parte, en 2007 se reportó en la especie *Morus nigra* (familia *Moraceae*) una lectina específica para los determinantes antigénicos T y Tn, diferente a la conocida previamente con afinidad por manosa (Singh et al., 2007), comportamiento similar al encontrado en este estudio para *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*.

En Lamiáceas no había sido reportada la presencia de dos lectinas diferentes en la misma semilla; de igual forma, la mayoría de las lectinas estudiadas son específicas para el antígeno T y/o Tn, y se han clasificado en el grupo de “lectinas tipo Leguminosa” (Rougé et al., 2011).

5.4.3 Determinación del punto isoeléctrico

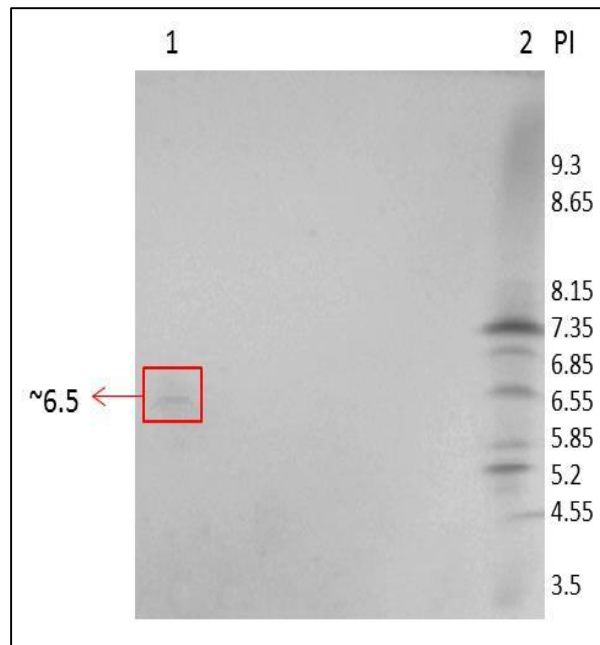
Se obtuvo para las dos lectinas una única banda alrededor de pH 6.5 (figuras 5-74 y 5-75); este valor es comparable con el reportado para las lectinas específicas para Man/Glc en *Dioclea sericea*, (6.64 – 6.85) (Sierra y Pérez, 1999) y *Galactia lindenii* (6.15) entre otras (Quintero, 2014).

Figura 5-74: Isoelectroenfoque de LLb-II, obtenida por cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B.



PAGE 10%. Carril 1. 30 µg de la lectina; carril 2. Patrones de corrida para Punto isoeléctrico.

Figura 5-75: Isoelectroenfoque de LSBo-II, obtenida por cromatografía de afinidad sobre Con A – Sepharose 4B.



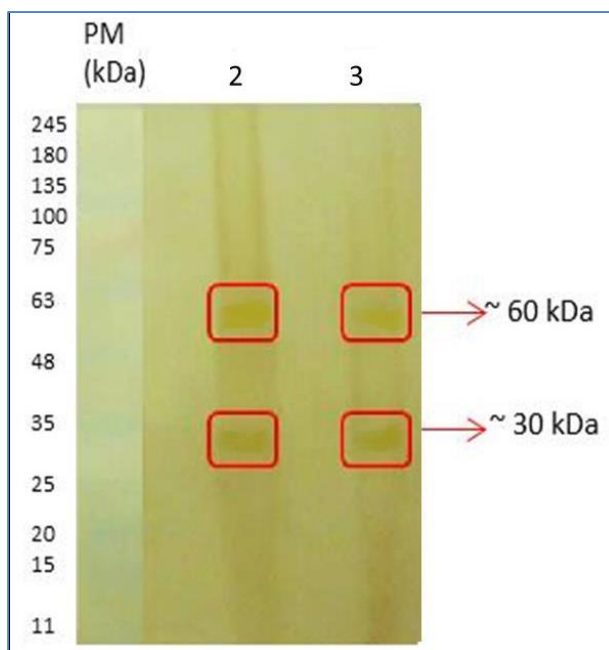
PAGE 10%. Carril 1. 30 µg de la lectina; carril 2. Patrones de corrida para Punto isoeléctrico.

Es interesante volver a mencionar que debido a las propiedades bioquímicas de las dos lectinas presentes en cada una de las especies (*Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*), mediante un paso de purificación es posible separar una de la otra desde el extracto crudo, ya que la diferencia en su punto isoeléctrico hace que una se obtenga en la fracción no retenida y la otra en la fracción retenida por cromatografía de intercambio aniónico sobre DEAE.

5.4.4 Detección de glicoproteínas

Las lectinas de LLb-II y LSBo-II se caracterizaron por ser glicoproteínas (Figura 5-76), característica previamente identificada por su interacción con Con A por cromatografía de afinidad. En los ensayos de detección de la glicosilación se observó en cada caso una banda alrededor de 30 kDa y otra en 60 kDa; lo que correspondería al monómero y dímero de cada una de las lectinas. Algunas lectinas no son glicosiladas, como es el caso de la concanavalina A y la lectina de *Dioclea grandiflora* (Melgarejo et al., 2005).

Figura 5-76: Membrana de nitrocelulosa, tratada para la identificación de glicoproteínas en LLb-II y LSBo-II, obtenidas por cromatografía de afinidad sobre Con A–Sepharose 4B.



PAGE 10%. Carril 1. Patrones de peso molecular; carril 2: 20 µg de LSBo-II; carril 3. 20 µg de LLb-II.

5.4.5 Obtención de la secuencia amino terminal de las lectinas purificadas

Para las dos lectinas se transfirió la banda de 30 kDa obtenida luego de la purificación por Con A-Sepharose 4B. La degradación de EDMAN arrojó una sola secuencia N-terminal de diez (10) aminoácidos “ **ADTIVAVELD**” (Anexos T y U). Utilizando la herramienta BLASTp para comparar la secuencia con las reportadas en el Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI), se estableció que no presenta ninguna similitud con lectinas de Lamiáceas reportadas, mientras que presenta el 100% de identidad con lectinas de la familia Leguminosa, tribu *Diocleae*, que presentan afinidad por Man/Glc (Tabla 5-21), lo cual confirma la idea de que en *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis* está presente una segunda lectina que reconoce manosa, y sugiere la posibilidad que en otras especies de Lamiáceas se presente más de una lectina.

Tabla 5-21: Secuencia amino terminal de Lectinas de la tribu *Diocleae* (tomada y modificada de Cavada et al., 2006)

Espece	Secuencia amino terminal	Referencia
<i>Camptosema pedicellatum</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYQH	Souza et al., 2012
<i>Canavalia brasiliensis</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPH	Grangeiro et al., 1997
<i>Canavalia ensiformis</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPH	Becker et al., 1975
<i>Canavalia marítima</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPH	Pérez et al., 1991
<i>Canavalia virosa</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPH	Osterne et al., 2016
<i>Cratylia floribunda</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYQH	Oliveira et al., 1991
<i>Cratylia mollis</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYQH	De Souza et al., 2003
<i>Cymbosema roseum</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPH	Cavada et al., 2006
<i>Dioclea grandiflora</i>	ADTIVAVELNSYPNTDIGDPNYPH	Naismith y Field, 1996
<i>Dioclea guianensis</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPH	Nagano et al., 2008
<i>Dioclea lehmannii</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPH	Pérez et al., 1991
<i>Dioclea sclerocarpa</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPH	Barroso et al., 2016
<i>Dioclea virgata</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPH	Batista et al., 2012
<i>Dioclea violácea</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPH	Bezerra et al., 2013

Resultados y análisis

El reconocimiento por Man/Glc o por oligosacáridos ricos en manosa no es una característica exclusiva de lectinas de Leguminosa, tribu *Diocleae*, por el contrario, existen especies como *Galanthus nivalis* (tribu *Galantheae*) (Van Damme, 1987), *Centrobium microchaete* (tribu *Dalbergieae*) (De Vasconcelos et al., 2015), entre otras (Debray, 1981), incluso especies de familias diferentes como la Jacalina (lectina de *Artocarpus heterophyllus*, familia *Moraceae*) que también tienen este reconocimiento (Barré et al., 2001).

En la tabla 5-22 se presentan las características moleculares de las lectinas específicas Man/Glc, de la familia de las Leguminosas y de la familia de las lamiáceas.

Tabla 5-22: Propiedades moleculares de las lectinas de Lamiáceas LLb-II, LSB0-II y otras lectinas de Leguminosas que reconocen manosa.

Propiedad	GLL-I ¹	DLL-I ^{2,3}	CRL-I ³	ConA (CEL-I) ^{3,4}	LSBo-II ⁵	LLb-II ⁶
M _r Subunidad (kDa) ⁷	29	25, 14	N.D.	26.5	30-33	30-34
M _r Proteína (kDa) ⁸	100	N.D.	N.D.	106	N.D.	N.D.
Bandas SDS-Page (kDa)	29, 60	25, 14	30, 18, 12	26, 14, 12.5	30, 60	30, 60
Glicosilación	Si	N.D.	N.D.	No	Si	Si
Azúcares neutros (%)	N.D.	1.7 – 1.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Punto isoeléctrico (pI)	6.15	8.0; 8.13 8.3; 8.42	N.D.	7.1	6.5	6.5
Inhibición por manosa (mM)	150	50	19.5	N.D.	N.D.	N.D.
Inhibición por p-Nitrofenil-β-D-manopiranos (mM)	16	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
N-terminal	N.D.	ADTIVAVELDSYP NTDIGDPSYPH	ADTIVAVELDSYP NTDIGDPSYPH	ADTIVAVELDTYP NTDIGDPSYPH	ADTIVAVELD	ADTIVAVELD

1 Lectina de *Galactia lindenni* (GLL-I). Quintero, 2014

2 Lectina de *Dioclea lehmanni* (DLL-I). Pérez et al., 1990

3 Lectina de *Cymbosema roseum* (CRL-I). Cavada et al., 2006

4 Lectina de *Canavalia ensiformis* Concanavalina A (CEL-I). Pérez, 1998

5 Lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-II). Este trabajo

6 Lectina de *Lepechinia bullata* (LBL-II). Este trabajo

7 Bajo condiciones reductoras

8 Sin calor ni condiciones reductoras

N.D. No determinado

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- A la fecha, los reportes de lectinas de especies pertenecientes a la familia Lamiaceae han mostrado reconocimiento del antígeno Tn, sin embargo, en este trabajo se encontró que tanto la lectina de *Lepechinia bullata* (LLb-I) como la de *Salvia bogotensis* (LSBo-I), reconocen también el antígeno T.
- En SDS-PAGE la lectina de *Lepechinia bullata* presentó un patrón de bandas en 28, 48 y 93 kDa. Las especies de mayor tamaño no lograron ser disgregadas a pesar de haberlas sometido a condiciones drásticas de reducción (DTT 2M y 100°C durante 15 minutos). Se sugiere que la especie de 93 kDa puede corresponder al tetrámero de la lectina.
- Se determinó la secuencia parcial de aminoácidos de la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo-I) utilizando como molde la lectina de *Salvia miltiorrhiza*, sobre la que se alinearon 181 aminoácidos de péptidos obtenidos por tripsinización, y se asignaron 35 residuos más (por estar conservados entre *Salvia miltiorrhiza* y *Gleheda*).

```
1-MATLLQNLLTATSRxxTLLDLNTRxSxTLLTHPNFNGDLGHGQHGGSGSQSPSPSRFxALTGALAQKVG-70
71-TSVHPNPSSNLEGGDAFEFVGPKxFxITxxxxxxxADGxAxFxxPVGxxxPSGSTGGYLGAVNPKGxGxx-140
141-xQGVADLNGxGSYGGGGNHGFCGSGSSNSELVQSSGLGHQESRxINYxxxxxYEELQVTAGxRKxx-210
211-xxSYEAELDDFVTLQVTVGLSAATSGDVEKDIxWxFTAxMxxxxxxxxxxxxxxxxGxxIRQxV-274
```

Los 17 péptidos alineados cubrieron el 62% de la secuencia esperada para *Salvia bogotensis*, que fue previamente reportada con 347 aminoácidos.

- El modelo generado para LSBo-I mediante I-Tasser, mostró una estructura conformada por nueve hebras β unidas mediante estructuras aleatorias, de forma similar a lo observado en las lectinas tipo Leguminosa. Esta aproximación se logró a pesar de tener hasta ahora un cubrimiento del 62% de la secuencia total de LSBo-I.

- En el modelo de LSBo-I generado computacionalmente se propone un sitio de unión a carbohidrato en el que están presentes Asp107, Tyr128, Gly155, Ser156, Gly157 y Asn161, entre otros aminoácidos, los cuales podrían interactuar con el antígeno T, Tn, Galactosa, N-acetilgalactosamina e incluso el antígeno Tn unido a un heptapéptido, siendo complejos energéticamente favorables. Para la interacción se sugiere que los grupos OH de los carbonos 3, 4 y 6 del azúcar ligando son sitios importantes para la interacción con LSBo-I.
- El modelo computacional obtenido para LSBo-I fue superpuesto con las estructuras tridimensionales de las lectinas de *Salvia miltiorrhiza* y *Vicia villosa* isolectina B₄, mostrando el alto grado de similaridad estructural de estas lectinas.
- El presente estudio permitió establecer que además de la lectina previamente reportada como específica para el antígeno Tn, tanto *Lepechinia bullata* como *Salvia bogotensis* poseen una lectina adicional que reconoce manosa (LLb-II y LSBo-II, respectivamente). La presencia de dos lectinas diferentes en la misma especie ha sido descrita previamente en especies de la familia Leguminosae, pero hasta ahora no había sido reportado en la familia Lamiaceae.
- A las nuevas lectinas encontradas, LLb-II y LSBo-II, que presentan reconocimiento por manosa, les fue determinada la misma secuencia amino terminal: ADTIVAVELD, la cual fue idéntica a la de varias lectinas de Leguminosae con afinidad por manosa. Así mismo, se encontró que son glicoproteínas con actividad aglutinante sobre eritrocitos A, T y Tn, presentan un punto isoeléctrico cercano a 6.5 y tienen un peso molecular alrededor de los 30 kDa, lo que coincide con los pesos moleculares reportados para lectinas con afinidad por glucosa/manosa pertenecientes a Leguminosae.
- LLb-I y LSBo-I, lectinas previamente reportadas en *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*, tienen un punto isoeléctrico (pI) cercano a 8.5, mientras que para las nuevas lectinas identificadas se determinó que está alrededor de 6.5. En varias especies de Leguminosae se han reportado dos lectinas con pI diferentes y con

valores cercanos a los que se obtuvieron en este trabajo, por lo tanto es posible sugerir que las Lamiáceas pueden compartir con las Leguminosas algunas características relacionadas con la expresión de lectinas.

- Tanto en semillas de *Lepechinia bullata* como de *Salvia bogotensis* fue posible separar las dos lectinas presentes mediante una cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE, obteniendo en la fracción no retenida la lectina que posteriormente se aisló con aMSB, y en la fracción retenida la que se aisló mediante Concanavalina A.
- La cromatografía de afinidad sobre Con A resultó ser un método eficiente para purificar las lectinas LLb-II y LSBo-II; por su parte, para obtener la lectina que reconoce aMSB, es necesario buscar otras alternativas que permitan purificarla en una calidad y cantidad suficiente para realizar análisis estructurales.
- La similitud entre la secuencia parcial determinada para LSBo-I y la reportada para *Salvia miltiorrhiza* (proteína clasificada en la familia de “lectinas de Leguminosa”), así como el haber encontrado que lectinas de Lamiáceas con reconocimiento por manosa tienen la misma secuencia amino terminal de lectinas de Leguminosa que también reconocen este carbohidrato, constituyen otra evidencia que apunta a que evolutivamente estas moléculas provienen de un ancestro común, y no son exclusivas de una familia taxonómica específica.
- En los ensayos preliminares para obtener una lectina recombinante, de los diferentes protocolos utilizados para extraer ARN se encontró que *Dynabeads mRNA DIRECT™ Micro Kit*, de *Life Technologies*, fue el más adecuado para el trabajo con semillas de *Lepechinia bullata*, pues permitió obtener un ARN mensajero de la calidad necesaria para poder realizar la síntesis de primera hebra; sin embargo la falta de primers específicos para el gen de la lectina, imposibilitaron su identificación y posteriores análisis para expresarla de forma recombinante.

6.2 Recomendaciones

- Purificar la lectina de *Lepechinia bullata* con reconocimiento por aMSB en buena cantidad y calidad, para poder identificar la secuencia amino terminal que permita diseñar primers específicos con los que sea posible encontrar el gen que la codifica, y continuar así los estudios para la obtención de la lectina recombinante, lo que posibilitará llevar a cabo otros estudios de tipo estructural y bioquímico.
- Continuar con la caracterización de las lectinas LLb-II y LSBo-II identificadas en semillas de *Lepechinia bullata* y *Salvia bogotensis*, para poder establecer una comparación de sus propiedades con las reportadas en otras especies vegetales.
- Determinar las constantes de afinidad, con el fin de analizar la posibilidad de utilizarlas como moléculas para la detección del antígeno T y/o Tn y como moléculas en aplicaciones clínicas y terapéuticas.
- Estudiar otras especies de Lamiáceas para identificar si también presentan más de una lectina, y determinar así, si es un comportamiento generalizado para esta familia taxonómica.
- Realizar estudios de actividad biológica para las lectinas que reconocen manosa y GalNAc y determinar sus posibles aplicaciones biotecnológicas.

16 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
2 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

A. Anexo: Cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith et al, 1985).

Reactivos:

- Solución al 1% de Ácido bicinconínico en agua destilada
- Patrón de Albúmina de Suero Bovina (BSA) en PBS 1X
- Buffer carbonatos pH 11.25
- Solución al 4% de Sulfato de cobre en agua destilada
- PBS 1X pH 7.2

Protocolo:

1. Disponer 20 μ L de muestra o de PBS 1X (como control negativo), en cada uno de los espacios de una microplaca de 96 pozos
2. Realizar diluciones seriadas de esta muestra en PBS (relación 1:1), manteniendo un volumen de 20 μ L
3. Adicionar en cada pozo 100 μ L de buffer carbonato pH 11.5
4. Adicionar en cada pozo 100 μ L del complejo BCA – CuSO₄
5. Incubar por 30 minutos a 37°C
6. Leer absorbancia a 540 nm

La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y puede ser determinada por comparación con una curva patrón de un estándar de proteína (generalmente Albumina Sérica Bovina (BSA)). Los detergentes iónicos y no iónicos no generan interferencia con el ensayo, pero sí lo hacen los agentes reductores. Su rango de detección esté entre 2-2000 mg/mL.

B. Anexo: Electroforesis en gel de poliacrilamida por el método de Laemmli.

Los siguientes son los volúmenes requeridos para la preparación de un gel (12.5% T, 2.7% C), por el método de Laemmli, (1970) .

Componente	Volumen (mL)	
	Gel separador	Gel concentrador
Agua desionizada	1.81	1.82
Buffer Tris-HCl 1 M pH 8.8	1.87	---
Buffer Tris-HCl 1 M pH 6.8	---	0.31
Acrilamida/Bisacrilamida 50% (48% Acrilamida, 1.5% bisacrilamida)	1.25	0.25
SDS 10%	0.05	0.025
Persulfato de amonio 10%	0.035	0.035
TEMED	0.008	0.008

Buffer de carga (Buffer muestra): Tris-HCl pH 6.8 50 mM, Glicerol 10%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.1%, DTT 100 mM, en agua desionizada.

La corrida se realizó a 100 voltios durante 1.5 horas con el buffer de corrida: Tris 25 mM, Glicina 192 mM pH 8.3, SDS 0.1%. Posteriormente se tiñó el gel con Instant Blue® durante 20 minutos, o se realizó fijación con ácido acético 10% durante 30 minutos y posterior tinción con coomasie blue G-250.

C. Anexo: Electroforesis en gel de poliacrilamida por el método de Schägger y Von Jagow.

Los siguientes son los volúmenes requeridos para la preparación de un gel (12.5% T, 2.7% C), por el método de Schägger y Von Jagow (1987) .

Componente	Volumen (mL)	
	Gel separador	Gel concentrador
Agua desionizada	1.55	1.0
Buffer TRIS-Tricina 3 M, 0.3% SDS pH 8.4	1.67	0.375
Acrilamida/Bisacrilamida 50% (48% Acrilamida, 1.5% bisacrilamida)	1.25	0.25
Glicerol	0.53	----
Persulfato de amonio 10%	0.035	0.035
TEMED	0.008	0.008

Buffer de carga (Buffer muestra): Tris-HCl 0.45 M pH 8.45, Glicerol 12%, SDS 4% Coomassie Blue G-250 0.0025% y Rojo de fenol 0.025%, DTT 100 mM, en agua desionizada.

La corrida se realizó a 100 voltios durante 1.5 horas con el buffer de corrida: Tris 100 mM, Tricina 100 mM, SDS 0.1%. Posteriormente se tiñó el gel con Instant Blue® durante 20 minutos, o se realizó fijación con ácido acético 10% durante 30 minutos y posterior tinción con coomasie blue G-250.

D. Anexo: Isoelectroenfoque

El proceso se realizó en condiciones nativas utilizando un gel de policarilamida al 10% y una mezcla de anfolitos en rangos de pH entre 5-8 y 3-10, en una proporción (5:1) (Bio-Lyte de Bio-Rad). La curva de calibración se realizó con patrones de punto isoeléctrico Protein mixture® de GE Healthcare, con un rango de pH de 3 a 10. Un patrón de hemoglobina fue corrido al tiempo con las muestras, con el fin de verificar el momento en el que las proteínas se ubican en su punto isoeléctrico (Bollag et al., 1991).

Componente	Volumen (mL)
Agua desionizada	8.74
Acrilamida/Bisacrilamida 50% (48% Acrilamida, 1.5% bisacrilamida)	2.0
Glicerol	1.0
Anfolitos	0.250
Persulfato de amonio 10%	0.025
TEMED	0.020

Buffer de carga (Buffer muestra): Glicerol 60%, Anfolitos 20%, Azul de bromofenol 0.1% en agua desionizada.

La corrida se llevó a cabo utilizando una solución de ácido fosfórico 0.1 M en el ánodo y una de NaOH 0.1 M en el cátodo. Se realizó una precorrida de 30 min a 200 voltios para enfocar los anfolitos. Posteriormente se sembró la lectina en buffer de muestra y se realizó una corrida a 200 voltios durante 1.5 horas. Finalmente se lavó el gel con TCA 10% por 30 minutos y se dejó en TCA 1% toda la noche. Se tiñó con coomassie G-250 y se analizó con el documentador de imágenes VersaDoc® (Bio-Rad).

E. Anexo: Transferencia a membrana de PVDF

A continuación se describe el protocolo para la transferencia de proteínas desde PAGE a membrana de PVDF (Matsudaira et al., 1987).

1. Cortar los trozos de membrana de un tamaño igual a cada uno de los geles que se van a transferir, y ponerlos en metanol al 100% durante 1 minuto.
2. Incubar la membrana y los geles después de haber terminado la electroforesis en buffer CAPS 1X (Ácido N-Ciclohexil-3-aminopropanosulfónico) (10 mM CAPS, 10% Metanol en agua desionizada).
3. Humedecer las almohadillas en el mismo buffer de transferencia (CAPS 1X). Se requieren 2 almohadillas por cada gel a transferir.
4. Ensamblar en la placa del equipo de transferencia, de abajo hacia arriba sobre el ánodo: una almohadilla, la membrana de PVDF, el gel a transferir y la segunda almohadilla, eliminando suavemente las burbujas que pudieran quedar (puede usarse como rodillo una pipeta Pasteur de vidrio) y verificando que haya suficiente buffer de transferencia humedeciendo el montaje.
5. Correr con las siguientes condiciones: 25 V, 100 mA y 2 W durante 40 minutos a 1 hora, verificando la transferencia de los patrones (si son preteñidos).
6. Lavar suavemente la membrana con agua desionizada.
7. Teñir la membrana con Coomassie R-250 durante 1 minuto aproximadamente.
8. desteñir con metanol al 50% durante 1 a 2 minutos, 2 o 3 veces, verificando que los marcadores no se destiñan.
9. Secar en cabina sobre una superficie limpia (caja de Petri)
10. El gel transferido puede teñirse con Instant blue para verificar la eficiencia de la transferencia.

F. Anexo: Detección de glicoproteínas en membrana de nitrocelulosa

A continuación se presenta el protocolo de tratamiento de la membrana de nitrocelulosa, después de haber sido transferida la muestra (Towbin et al., 1979) para detectar glicoproteínas (Vega, 1997).

1. Lavar con PBS 1X filtrado, durante 10 minutos.
2. Oxidar con metaperiodato de sodio 30 mM (0.081 g en 7 mL) en buffer acetato-acético 100 mM pH 5.0-5.5, durante 20 minutos.
3. Lavar con PBS 1X filtrado por 10 minutos, repitiendo 3 veces cada lavado.
4. Incubar con Biotina-hidrazina a una concentración 1.3 mM, disuelta en 0.1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1 mL buffer acetato-acético 100 mM pH 5.0-5.5, por 60 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar con PBS 1X filtrado por 10 minutos, repitiendo 3 veces el lavado.
6. Bloquear de la membrana con PBS 1X-BSA 1.3% a 37°C por 30 minutos, e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.
7. Lavar con PBS 1X filtrado por 10 minutos, repitiendo 3 veces cada lavado.
8. Incubar con solución de estreptavidina-peroxidasa 1:500 en PBS-BSA 1.3% durante 60 minutos.
9. Lavar con PBS 1X filtrado por 10 minutos, repitiendo 3 veces cada lavado. Hacer un último lavado rápido con PBS 1X filtrado.
10. Revelar con DAB (3,3'-diaminobenzidina) (50 mg/100 mL PBS 1X filtrado) precalentado a 30°C. Adicionar 20 µL de peróxido de hidrógeno al 30% frío. Incubar hasta que se empiecen a evidenciar las bandas.
11. Lavar rápidamente con agua desionizada para detener la reacción.

17 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
0 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

12. Secar al aire sobre una superficie limpia.

Las condiciones de la transferencia semihumeda fueron 25 V, 130 mA y 5 W durante 30 minutos para alcanzar un $V \cdot H = 7$.

La tinción con rojo ponceau como un control de transferencia, se realizó durante 10 minutos y se eliminó el colorante en exceso.

G. Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de LLb-I.

Institut de Biologie Structurale
Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré
Directrice : Nicole THIELENS

Grenoble, june 6th 2013

to: Dr ANNABELLE VARROT
Centre de Recherche sur les Macromolécules végétales (CERMAV)
UPR-CNRS 5301
BP53
F-38041 Grenoble Cedex 9

From: JEAN-PIERRE ANDRIEU
IRPAS (Immune Response to Pathogens and Altered Self)
Institut de Biologie Structurale
41 rue Jules Horowitz - 38027 Grenoble cedex 1

**Results of the N-terminal protein sequence analysis
of sample:**

4A

Sequence run #7366C



Protein Sequence Determination

Amino acid sequence determination based on Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492 (s/n: 9510287J). Phenylthiohydantoin amino acid derivatives generated at each sequence cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems Model 610A (software version 2.1). The PTH-amino acid standard kit (Perkin-Elmer P/N 4340968) was used and reconstituted according to the manufacturer's instructions (900776 Rev D). The procedures and reagents used were as recommended by the manufacturer. Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequence cycle. Retention times and integration values of peaks were compared to the chromatographic profile obtained for a standard mixture of derivatized amino acids.

Sequence run #7366C

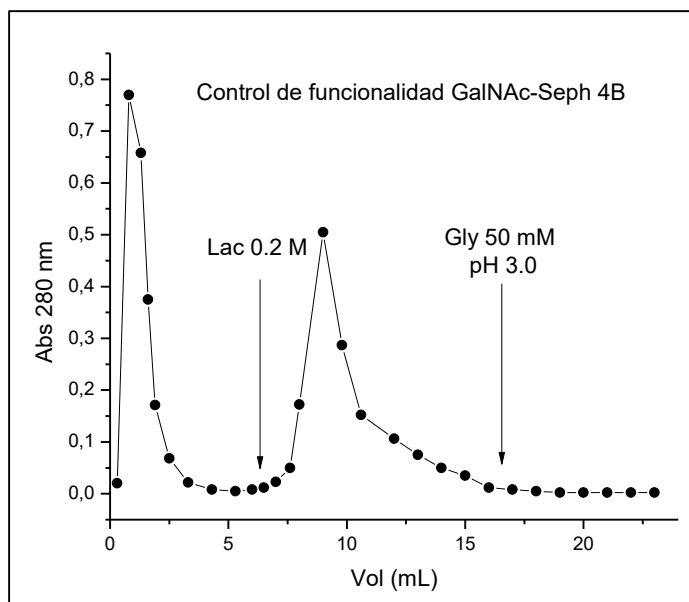
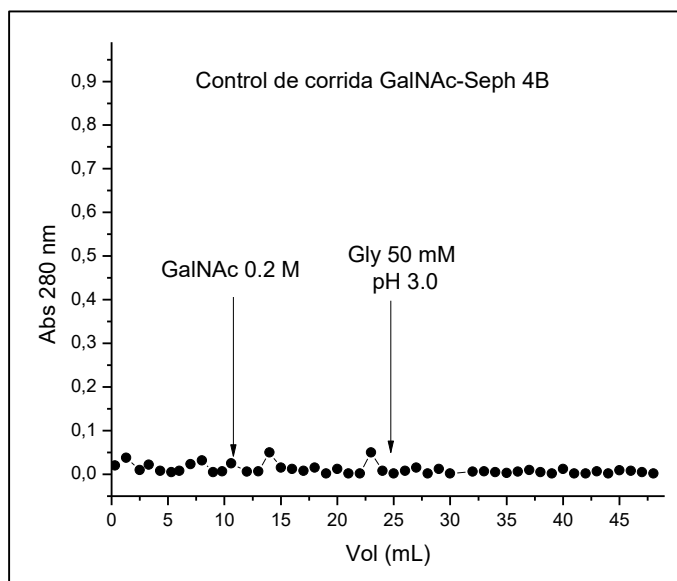
Due to the low amount of protein or to a blocked n-terminus, the analysis gave no result.

Sequence determination analyses were performed by J.-P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/UJF, Grenoble, France).



Jean-Pierre ANDRIEU

H. Anexo: Control de elución y de funcionalidad del soporte N-acetilgalactosamina-Sepharose 4B



I. Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de la lectina de LSBo-I

Institut de Biologie Structurale
Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré
Directrice : Nicole THIELENS

Grenoble, march 26th 2013

to: ANNABELLE VARROT
Centre de Recherche sur les Macromolécules végétales (CERMAV)
UPR-CNRS 5301
BP53
F-38041 Grenoble Cedex 9

From: JEAN-PIERRE ANDRIEU
IRPAS (Immune Response to Pathogens and Altered Self)
Institut de Biologie Structurale
41 rue Jules Horowitz - 38027 Grenoble cedex 1

**Results of the N-terminal protein sequence analysis
of sample:**

SBOL 1

Sequence run #7294C



Protein Sequence Determination

Amino acid sequence determination based on Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492 (s/n: 9510287J). Phenylthiohydantoin amino acid derivatives generated at each sequence cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems Model 610A (software version 2.1). The PTH-amino acid standard kit (Perkin-Elmer P/N 4340968) was used and reconstituted according to the manufacturer's instructions (900776 Rev D). The procedures and reagents used were as recommended by the manufacturer. Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequence cycle. Retention times and integration values of peaks were compared to the chromatographic profile obtained for a standard mixture of derivatized amino acids.

Sequence run #7294C

Sequence found:

(V or A) (K or I) V T S F X Y T S F S S S D (I or L) (T or K) L Q

Sequence determination analyses were performed by J.-P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/UJF, Grenoble, France).



Jean-Pierre ANDRIEU

J. Anexo: Péptidos trípticos antes de eliminar redundancia

LSSPATLDSR	VQALEEADNDLENK	NMQDMVEDYR	KDVDNAYMLK
LSSPATLDSR	SMQDVVEDYK	EAEASLYQSK	QLETLSGDR
LSEDKNPDYR	FLEQQNQVLQTK	ETAESWYQTK	FLEQQNQVLQTK
LSSPATLDSR	YFSMTEVDR	APSTYGGGLSVSSR	TNQELQELNR
YLDGLTAER	STMQELNSR	AQYEDLAQK	TAAENDFVTLK
YEELQLTAGR	VQALEEANDDLENK	NKYEDELNKR	VHAAGTQQPYGLDSR
FEETTADGR	VGLSAATSGDGVQK	DMQDMVEDYR	QGVDAADLDGLR
TSVLNAEVK	EASLAETEGR	TLLDLNTR	LKFEMEQLNR
TPAQYDASELK	VTMQNLNDR	SKAEAVPDYQSK	LSETNVLLSMDNNR
EELQLTAGR	FLEQQNQVLQTK	TAAENDFVTLKK	NMQDMVEDYR
SKAEAESLYQSK	LEVLEEELR	LSLSTSGGSFR	NVELDPELQK
YLDGLTAER	GTLENSLEETK	LKFEMEQLNR	PSQQELNQLLK
LNDLEDALQQAQ	TLLEGEESR	VDALMDELNFMK	GFSSGS AVVSNSR
VTMQNLDDR	SSPATLNSR	TAAENDFVTLKK	TLDNDLMLLK
FSNSSSNEFSK	AAMLVNQLSK	QGVDAADLNGLR	TEAESSMYQTK
SKAEAESLYQSK	FLEQQDQVLQTK	ALEESNYELEGK	DVDGAYMTK
LAESNYELEGK	QFSSSYLSR	SKEEAEALYHSK	LLTHPNFNGD
VDPELQNVK	VQALEEANDDLENK	NVKVDPELQNVK	LAQAYYESTR
YEELQQTAGR	TLGLDSDQGPTAAK	QGVDAADLDGLR	DVDGAYMTK
TGGYLGAVNPK	VTMQNLNDR	LAGGGLSSVGGGSSTLK	ELTALAPSTMK
LNDLEDALQQAQ	AQYEELANR	QLQNLLQATSR	LGTDTTYAPFSSK
SSPATLNSR	SSGGFSGGSFSSR	NVKVDPELQNVK	LQGELAHVK
VGLSAATSGDGVQK	DVDNAYMLK	TLDNDLMAVK	LENELQTYR
APSTYGGGLSVSSR	MATLLQEQGTK	AEGPDLYQSK	LRSELDNVKK
VGLSAATSGDGVQK	SAATSGDGVQK	AQGELAFSDK	TNAENEFVTLKK
SLVNLGGSK	TLSDYNLQK	TAAEDDFVTLKK	QSVEADLDGLR
LAEEANADLEVK	NKYEDELNKR	LSSVLAGGSCR	LENELQTYR
DVDNAYMLK	YEELQVTAGR	QGVDAADLNGLR	LFEQQNQVLQTK
LSSPATLNSR	SKAEAESLYESK	NSSPATRASR	TLPEPPMLK
TTMLLLPNK	VGLSAATSGDGVQK	TAAENDFVTLK	TMQNTSDLD TAR
STMQELDSR	LQSQFTDAQK	LAESNYELEGK	SKEEAEALYHSK
VDPELQNVK	LTDNDLMLSR	VTMQNLNDR	PATPATLNSR
LSSPATLNSR	VTMQNLNDR	VGANTYLASGK	GEEAMAFNEK
DVDAAYMNK	AGGGALGVVNP	LSFTELSR	SGGGGGGLGSGGSLR
PSGSTGGYLGAVNPK	YDQELMNTK	LQDMAYDKK	YEELQVTVGR

Referencias

AEAESLYQSK	QNVQGVDLR	FSSSSGYGGGSSR	VDDGAYMTK
TLLEGEESR	GSAGGQLGVVNP	GTLENSLEETKGR	GFSSGSAVVSNSR
QLLEGEESR	VQALEEANNDLENK	SKEEAEALNWSK	FFSADLNLGR
VGLSAATSGDGVQK	AQYEELAQR	TSVHPNPSSNLGR	RGVTTAGTTSER
LAEEANADLEQK	LFEQQNQVLQTK	KDVDGAYMTK	LAALMDKPVK
TLLEGEESR	ATFQEALDAAGDK	VLLSMDNSR	NVQDALADAEQR
NKYEDELNK	AQYEELAQR	EVATNSELVQSGK	NMQDMVEDYR
LSSPATLNSR	LSSPATLNSR	DAENNNPSNNLK	LKYENEVALR
VTMQNLDDR	LTDNDLFLTR	AGAYEDLAQK	RSEPLYNSR
FSSSSGYGGGSSR	VAGGGGGFGAAGGFNR	DAEAMAFNEK	SLYNLGGSKR
AEAESLYQSK	LRSELDNVK	NAENNNPSNNLK	KVDPELQNVK
LRSELDNVK	AATSGDGVQK	EESNYELEGK	FGDSNTVMR
LSSPATLNSR	QSLEASLAETGR	YDAFAGPSVK	SLVGLGGTK
LSSPATLNSR	STSSFCLSR	VTSTLSSNVASK	GSCGLGGGLGGSSR
TLLEGEESR	LGLGGRGGSGGSYGR	AALLYDCNGAK	ATGGGLSSVGGGSSTLK
KYEDELNKR	VTATDLDEPDTLHTR	NKYEDELNK	VLDELTLTK
STMQELNSR	AQYEDLAQK	DMQDMVEDYR	SGFSSVSVSR
LSSPATLNSR	AQYEELAQR	NVQDALADAEQR	LSGYTDNAGVSQK
KYEDELNKR	AEAEALYQTK	LNLQNPQTAPK	VDDNAYMLK
VGLSAATSGNGVQK	LKFEMEQLNR	ALTGALAQK	LDDLEDALQQAQ
EESNYELEGK	AGEVQPELR	YTVVTGNMGSNDK	YLDGLTAER
VTMQNLNDR	DKYEDELNKR	FLEQQNQVLQTK	EVASNSELVQSSR
ETQSQLETER	LRAELDNVK	EGGDAFEFVGPK	RSSGGGGGGGLGSGGSLR
YGSGGGSKGGSLSGGGYGSGGGK		GYSGSGGGSYSGGGGNHGFCSGSSSNYR	
QSLGHGQHSGSGSQSPSPSR		GPYESGSGHSSGLGHQESR	
GPYESGSGHSSGLGHQESR		AAFGGSDLWSSGGGYSSGSSSYGSGGR	
SNGGGGSLSGGGYGSGGGSNR		LLEEGDAHLSSSQFSSGSQSSR	
DPVGHGQHSGSGSQSPSPSR			

K. Anexo: Especies de Leguminosas que presentaron mayor identidad con algunos péptidos trípticos de LSBo-I

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> BURP domain protein [Medicago truncatula]	27.4	128	70%	0.79	100%	XP_013456398.1
<input type="checkbox"/> BURP domain protein [Medicago truncatula]	27.4	128	70%	0.79	100%	XP_013456397.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: putative hydrolase C777.06c [Cicer arietinum]	24.8	24.8	70%	6.5	86%	XP_004485977.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein TSUD_43710 [Trifolium subterraneum]	24.4	55.4	100%	9.2	60%	GAU32328.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein TSUD_43700 [Trifolium subterraneum]	24.4	39.9	100%	9.2	60%	GAU32329.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: uncharacterized protein LOC109355196 isoform X3 [Lupinus angustifolius]	24.4	24.4	90%	9.2	73%	XP_019453750.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein GLYMA_05G138200 [Glycine max]	24.4	24.4	100%	9.2	70%	KRH58597.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein LR48_Vigan08g006100 [Vigna angularis]	24.4	24.4	90%	9.2	80%	KOM49234.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein TSUD_118420 [Trifolium subterraneum]	24.4	24.4	90%	9.2	67%	GAU28235.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein TSUD_239870 [Trifolium subterraneum]	24.4	24.4	90%	9.2	67%	GAU47030.1
<input type="checkbox"/> DNA replication complex GINS protein PSF1 [Medicago truncatula]	24.4	24.4	90%	9.2	67%	XP_003597996.1
<input type="checkbox"/> DNA replication complex GINS protein PSF1 [Medicago truncatula]	24.4	24.4	90%	9.2	67%	XP_013467542.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: DNA replication complex GINS protein PSF1 [Cicer arietinum]	24.4	24.4	90%	9.2	67%	XP_004498667.1
<input type="checkbox"/> 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase like 3 [Glycine soja]	24.4	24.4	100%	9.3	70%	KHN26833.1
<input type="checkbox"/> partner of SLD five protein, putative [Medicago truncatula]	24.4	24.4	90%	9.3	67%	XP_003622789.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 3-like [Glycine max]	24.4	24.4	100%	9.4	70%	XP_006585415.1
<input type="checkbox"/> Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94 [Cajanus cajan]	24.0	38.2	80%	13	100%	KYP50444.1
<input type="checkbox"/> P-loop nucleoside triphosphate hydrolase superfamily protein [Medicago truncatula]	24.0	39.5	100%	13	60%	XP_003592170.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2 [Lupinus angustifolius]	23.1	38.6	90%	26	86%	XP_019417445.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2 [Arachis ipaensis]	23.1	56.2	90%	26	86%	XP_016188853.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2-like [Arachis duranensis]	23.1	56.2	90%	26	86%	XP_015954220.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2 [Vigna radiata var. radiata]	23.1	23.1	70%	26	86%	XP_014498451.1
<input type="checkbox"/> hypothetical protein PHAVU_009G223400g [Phaseolus vulgaris]	23.1	40.7	80%	26	86%	XP_007138613.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2 [Glycine max]	23.1	23.1	70%	26	86%	XP_003533803.1
<input type="checkbox"/> Protein Red [Cajanus cajan]	23.1	40.7	80%	26	86%	KYP39340.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2-like [Arachis duranensis]	23.1	56.2	90%	26	86%	XP_015943746.1
<input type="checkbox"/> Red-like protein amino-terminal region protein [Medicago truncatula]	23.1	38.6	80%	26	86%	XP_013463630.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: suppressor of mec-8 and unc-52 protein homolog 2 [Vigna angularis]	23.1	23.1	70%	26	86%	XP_017422608.1

L. Anexo: Especies de Lamiáceas que presentaron mayor identidad con algunos péptidos trípticos de LSBo-I

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07422.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07421.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07420.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07419.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07418.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07425.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07424.1
<input type="checkbox"/>	monoterpene synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AEX07423.1
<input type="checkbox"/>	terpene synthase 6 [Thymus vulgaris]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGA96119.1
<input type="checkbox"/>	alpha-terpineol [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGK88257.1
<input type="checkbox"/>	alpha-terpineol [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGK88256.1
<input type="checkbox"/>	alpha-terpineol [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGK88251.1
<input type="checkbox"/>	alpha-terpineol synthase [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGK88250.1
<input type="checkbox"/>	terpene synthase 1 [Origanum vulgare]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	ADK73623.1
<input type="checkbox"/>	terpene synthase 1 [Origanum vulgare]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	ADK73622.1
<input type="checkbox"/>	terpene synthase 5 [Thymus vulgaris]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGS42398.1
<input type="checkbox"/>	terpene synthase 7 [Thymus vulgaris]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGA96120.1
<input type="checkbox"/>	terpene synthase 7 [Origanum vulgare]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	ADK73614.1
<input type="checkbox"/>	alpha-terpineol [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGK88260.1
<input type="checkbox"/>	alpha-terpineol [Thymus caespititius]	19.7	19.7	50%	4.9	100%	AGK88259.1
<input type="checkbox"/>	basic helix-loop-helix transcription factor [Salvia miltiorrhiza]	19.3	19.3	70%	6.9	86%	AKN09548.1
<input type="checkbox"/>	RNA polymerase beta subunit [Scutellaria insignis]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	YP_009183582.1
<input type="checkbox"/>	RNA polymerase beta subunit-2 [Scutellaria baicalensis]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	YP_009162251.1
<input type="checkbox"/>	RNA polymerase beta" subunit [Tectona grandis]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	YP_007353905.1
<input type="checkbox"/>	RNA polymerase beta' subunit [Premna microphylla]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	YP_009117211.1
<input type="checkbox"/>	RNA polymerase beta" subunit [Pogostemon stellatus]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	YP_009309354.1
<input type="checkbox"/>	RNA polymerase beta" subunit [Pogostemon yatabeanus]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	YP_009309267.1
<input type="checkbox"/>	rpoC2 [Pogostemon cablin]	18.9	18.9	70%	9.9	71%	ANQ46315.1

M. Anexo: Secuencia peptídica de la lectina de *Glechoma hederácea* (Gleheda)

>gi|22773748|gb|AAN05097.1| lectin [Glechoma hederacea]

MANQKLPQTLVSIAALFLMVANMALSKTTHFAVPPALTFQGDAFDPNDTSFIRLTTSHWTSVGRVMYSKP
LTFWGEKGQVHFKTKISFNITSIAGNKADGVALFMVPVGPPIPNGGAGGNLGLFDSSGVGKSIFAVKFDT
HANVWDPPCRHIGINVNSRVPVAHKCMDSDSVNWEDVTLVINYDEADKIITVRAQVGLTKHYDLSHKLDLS
TILEKKVQVGLSASTGTNIALHDINYWEFTANMICDSDSDSVDGAGIRQLVST

N. Anexo: Secuencia peptídica de la lectina de *Salvia miltiorrhiza*

>gi|156616771|gb|ABU87404.1| SMLII [Salvia miltiorrhiza]

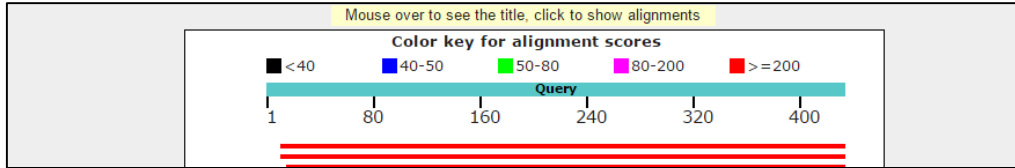
MAKLLQNLIPLLSAIVLLLAAANTVRSQTTSFTYDFWGDQPNDLIYQGS AHFPSRTTFLRLTDALSSQVG

RVVHSNPVQFSQGGNQVDFETTVNFIITPGPDNTPADGLAFFIAPVGT TAPTGSNGANLGVFESNGNGAA

VFAVEVDTYVNGAWDPLYPHIGIDIGSRASSNTTQVDSSILGQQVTLLIN YVGATRMITAKVTAGSKTFE

VSYEYDLSDFVTEQVQVGLSASTGQHVATHDIVSWYFTATMVQSKAVARS RKELAGNIIRQFV

O. Anexo: Alineamiento del fragmento de ADN amplificado con los primers “Can” para *Lepechinia bullata*.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Perilla frutescens var. crispa isolate KOR18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	532	532	97%	2e-147	88%	KR921739.1
Perilla frutescens var. crispa isolate KOR12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	532	532	97%	2e-147	88%	KR921738.1
Rehmannia glutinosa bio-material NO.4 Shennonqshan Dihuang 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	531	531	96%	7e-147	88%	FJ598596.1
Perilla frutescens var. hintella 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220701.1
Perilla frutescens var. frutescens 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220698.1
Perilla frutescens var. crispa cultivar atropurpurea 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220697.1
Perilla frutescens var. crispa 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220696.1
Perilla frutescens f. crispidiscolor 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220695.1
Perilla frutescens var. acuta 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220694.1
Perilla citriodora 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, complete sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KT220693.1
Perilla frutescens var. crispa isolate CHI15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KR921742.1
Perilla frutescens var. crispa isolate KOR20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KR921741.1
Perilla frutescens var. crispa isolate KOR19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KR921740.1
Perilla frutescens var. crispa isolate JPN8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KR921736.1
Perilla frutescens var. crispa isolate JPN6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	529	529	96%	3e-146	88%	KR921735.1

Download GenBank Graphics

Perilla frutescens var. crispa isolate KOR18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [KR921739.1](#) Length: 1693 Number of Matches: 1

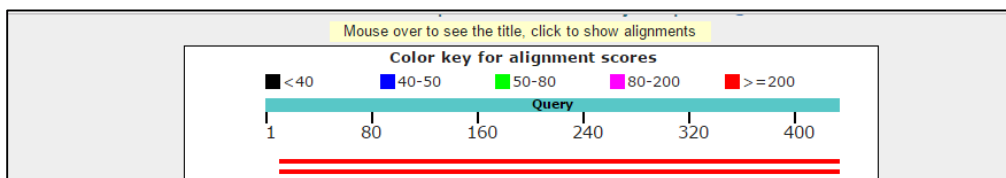
Range 1: 360 to 789 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
532 bits(288)	2e-147	379/431(88%)	9/431(2%)	Plus/Minus

```

Query 11  GAAATGCCACCTTAATAAGGAYCKAARTCCTATAATGTTATCCCATGCTAATGTATCSAR 70
Sbjct 789  GAAAGGCCAACGTAATA-GGACCGAAATCCTATAATGTTATCCCATGCTAATGTATCCAG 731
Query 71  AGCGYACATTTGCTTGGAG-ACCTCAATTTCTTCAAAGTAACAGCGCCGATGCTCGACC 129
Sbjct 730  AGCGTAGGCTTGGCTTTGAGCACTCAATTTCTCAAAGTAACAGCGCCGGAGGCAGCACC 671
Query 130  CGGCCAINTTAAGACCTGGAKGCAATCGCCGGCAGAAGGGACRAGACGACCGGTGCA-TCC 188
Sbjct 670  CGGCCAGTTAAGACCGAGGCGCATCGCCGGCAGAAGGGACGAGACGACCGGTGCACACC 611
Query 189  GTACGGCGGACCGCCGAACCAACCCAAAKTCCAACACAGCTTTTTATYTGTAACCTAC 248
Sbjct 610  GAGAGCGGACCGCCGACCAACCCAAAGTCCAACACTAGAGCTTTTTAAC TGCAACAAC 551
Query 249  TTAATATACGCTATTGGATCTGGAATACC CGGGTGCTGGCACCAAAYTTGCCCTC-Y 307
Sbjct 550  TTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATACC CGGGTGCTGGCACAGACTTGCCTCCA 491
Query 308  ATGGATCCTCGTTAAGGGATTTARATTGTA-TCATTCCAATTAC-WNACTCT-AKAGCYC 364
Sbjct 490  ATGGATCCTCGTTAAGGGATTTAGATTGTACTCATTCCAATTACCAGACTTAAGAGCCC 431
Query 365  GGTATTGT-ATTTATTGTCA-TACCTCCCGGTGTYAKGATTGGGTAATTTGCGCGCTGCG 422
Sbjct 430  GGTATTGTATTTATTGTCACTACCTCCCGGTGTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCTGCG 371
Query 423  TGCCTTCCTTG 433
Sbjct 370  TGCCTTCCTTG 360
    
```

P. Anexo: Alineamiento del fragmento de ADN amplificado con los primers “Craty” para *Lepechinia bullata*.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Perilla frutescens var. hirtella 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA g	510	510	85%	7e-141	99%	KT220701.1
Perilla frutescens var. frutescens 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RN	510	510	85%	7e-141	99%	KT220698.1
Perilla frutescens var. crispa cultivar atropurpurea 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and	510	510	85%	7e-141	99%	KT220697.1
Perilla frutescens var. crispa 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA g	510	510	85%	7e-141	99%	KT220696.1
Perilla frutescens f. crispidicolor 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal R	510	510	85%	7e-141	99%	KT220695.1
Perilla frutescens var. acuta 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA g	510	510	85%	7e-141	99%	KT220694.1
Perilla citriodora 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, comple	510	510	85%	7e-141	99%	KT220693.1
Perilla frutescens var. crispa isolate CHI15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921742.1
Perilla frutescens var. crispa isolate KOR20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921741.1
Perilla frutescens var. crispa isolate KOR19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921740.1
Perilla frutescens var. crispa isolate JPN8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921736.1
Perilla frutescens var. crispa isolate JPN6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921735.1
Perilla frutescens var. frutescens isolate JPN5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921734.1
Perilla frutescens var. frutescens isolate JPN4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921733.1
Perilla frutescens var. frutescens isolate JPN3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921732.1
Perilla frutescens var. frutescens isolate JPN2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921731.1
Perilla frutescens var. frutescens isolate JPN1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	510	510	85%	7e-141	99%	KR921730.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Perilla frutescens var. hirtella 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, complete sequence

Sequence ID: [KT220701.1](#) Length: 7456 Number of Matches: 1

Range 1: 640 to 921 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
510 bits(276)	7e-141	281/283(99%)	1/283(0%)	Plus/Plus

```

Query 12  TTTGGGTTGGGTCGGCCGGTCCGCCTTTTCGGGTGTGCACCGGTCGTCTCGTCCCTTCTGCC 71
Sbjct 640  TTTGGGTTGGGTCGGCCGGTCCGCCTCTCGGTGTGCACCGGTCGTCTCGTCCCTTCTGCC 699

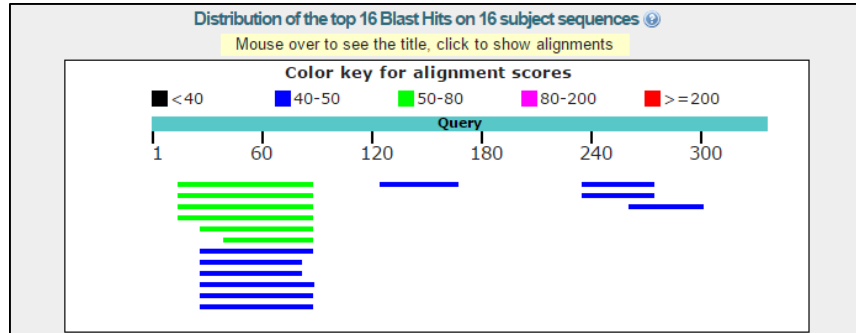
Query 72  GGCAGTGCCTCCTGGTCTTAAGCAAGCCTACGCTCTGGATACATTAGCATGGGATAACATTATAG 131
Sbjct 700  GGCAGTGCCTCCTGGTCTTAAGCAAGCCTACGCTCTGGATACATTAGCATGGGATAACATTATAG 759

Query 132 AATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGGATACATTAGCATGGGATAACATTATAG 191
Sbjct 760  AATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTACGCTCTGGATACATTAGCATGGGATAACATTATAG 819

Query 192  GATTTTCGGTCTATTACGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAACAGGGACAGCCGT 251
Sbjct 820  GATTTTCGGTCTATTACGTTGGCCTTCGGGATCGGAGTAATGATTAACAGGGACAGCCGT 879

Query 252  GGGCATTTCGATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCCTGGACTTT 294
Sbjct 880  GGGCATTTCGATTTTCATAGTCAGAGGTGAAATTCCTGGACTTT 921
    
```

Q. Anexo: Alineamiento del fragmento de ADN amplificado con los primers “Dgf mn” para *Lepechinia bullata*.



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum synaptotaqmin-2 (LOC105166063). mRNA	68.0	68.0	21%	1e-07	83%	XM_011085283.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum synaptotaqmin-2-like (LOC105165995). mRNA	68.0	68.0	21%	1e-07	83%	XM_011085165.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Erythranthe guttatus synaptotaqmin-2 (LOC105956407). transcript variant X2. mRNA	64.4	64.4	21%	2e-06	82%	XM_012980252.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Erythranthe guttatus synaptotaqmin-2 (LOC105956407). transcript variant X1. mRNA	64.4	64.4	21%	2e-06	82%	XM_012980251.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum synaptotaqmin-2-like (LOC105159354). mRNA	64.4	64.4	18%	2e-06	84%	XM_011076392.1
<input type="checkbox"/> Sorghum bicolor plant synaptotaqmin (NTMC2T1.1). mRNA	53.6	53.6	14%	0.003	84%	XM_002464482.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Thammophis sirtalis interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2). transcript variant X2. mRNA	50.0	50.0	11%	0.037	88%	XM_014059150.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Thammophis sirtalis interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2). transcript variant X1. mRNA	50.0	50.0	11%	0.037	88%	XM_014059149.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucumis sativus synaptotaqmin-2 (LOC101203849). mRNA	50.0	50.0	18%	0.037	79%	XM_004152597.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Capsicum annuum synaptotaqmin-1-like (LOC107840565). transcript variant X2. mRNA	48.2	48.2	16%	0.13	80%	XM_016684468.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Capsicum annuum synaptotaqmin-1-like (LOC107840565). transcript variant X1. mRNA	48.2	48.2	16%	0.13	80%	XM_016684467.1
<input type="checkbox"/> Cucumis melo genomic chromosome_chr_3	48.2	48.2	18%	0.13	78%	LN713257.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cucumis melo synaptotaqmin-2 (LOC103488056). mRNA	46.4	46.4	18%	0.45	77%	XM_008446600.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Arachis ipaensis synaptotaqmin-2-like (LOC107628776). mRNA	46.4	46.4	18%	0.45	77%	XM_016331372.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Ziziphus jujuba transcription factor EMB1444-like (LOC107430801). transcript variant X1. mRNA	42.8	42.8	12%	5.5	83%	XM_016041663.1
<input type="checkbox"/> Escherichia phage PBECO 4. complete genome	42.8	42.8	12%	5.5	82%	KC295538.1

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

PREDICTED: Sesamum indicum synaptotaqmin-2 (LOC105166063). mRNA
 Sequence ID: [XM_011085283.1](#) Length: 1716 Number of Matches: 1

Range 1: 338 to 412 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

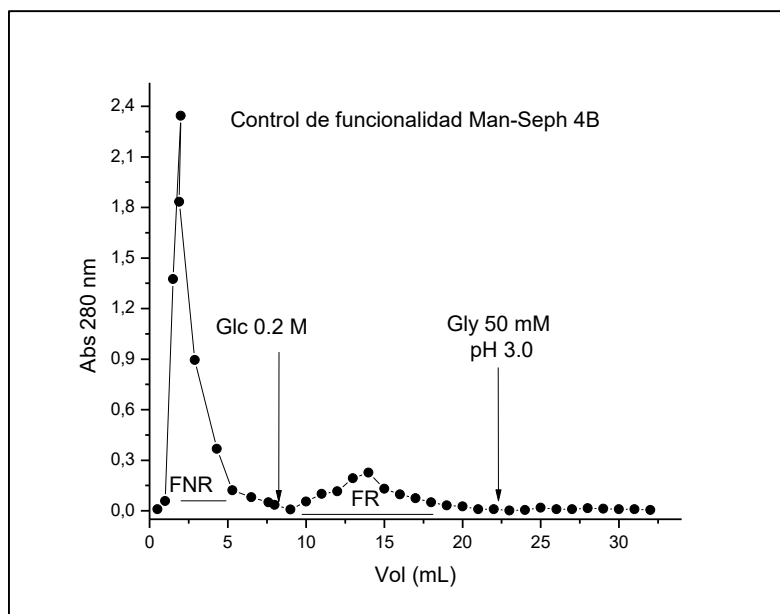
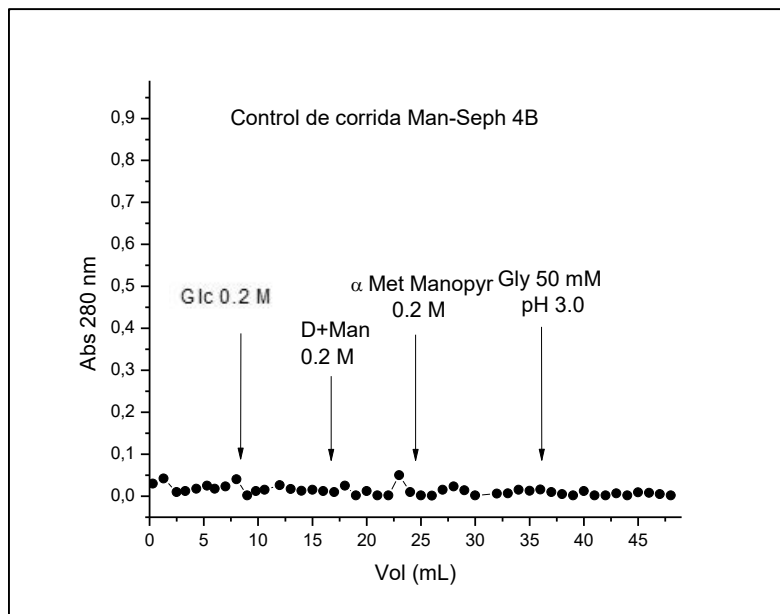
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
68.0 bits(74)	1e-07	63/76(83%)	3/76(3%)	Plus/Plus

```

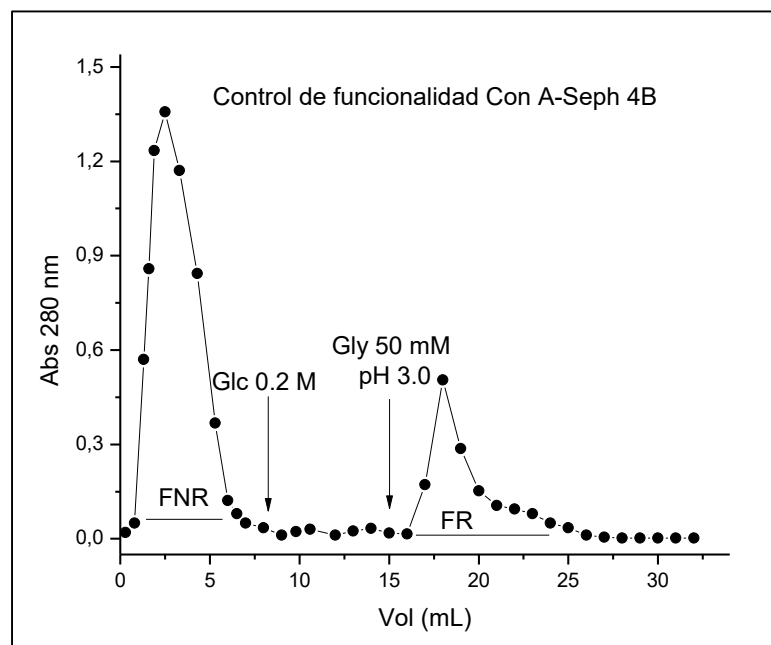
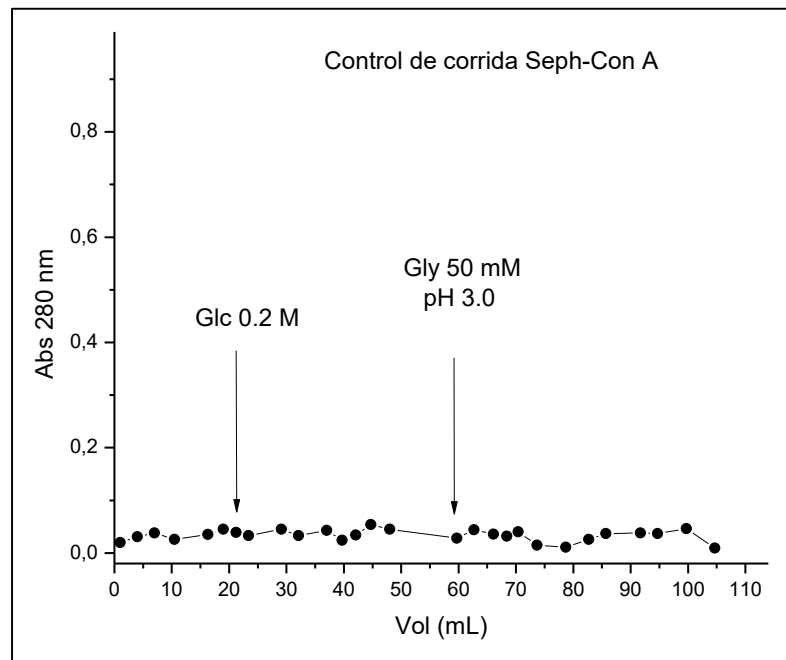
Query 15  AATTCCCA-GTACAAA-TCGATT CAGCTTGACTTTGAGACACTAACTTTGGGGCTGCCTAC 72
Sbjct 338  AATTCCAAAGTACAAAATTGATTCTG-TAGAATTTGAAACTCTAACTTTGGGGCTGCCTAC 396

Query 73  CACCTACCTTTTAAGG 88
Sbjct 397  CGCCTACTTTTGAAAGG 412
    
```

R. Anexo: Control de elución y de funcionalidad del soporte Manosa – Sepharose 4B.



S. Anexo: Control de elución y de funcionalidad del soporte Concanavalina A – Sepharose 4B.



T. Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de la lectina de LLb-II

Institut de Biologie Structurale
Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré
Directrice : Nicole THIELENS



Grenoble, august 11th 2015

to: Annabelle VARROT
CERMAV-CNRS
BP 53
38041 Grenoble cedex 9, France

From: Jean-Pierre ANDRIEU
Institut de Biologie Structurale
Plateforme Seq3A : Séquençage et Analyse d'Acides Aminés
Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré
CEA/Grenoble/Bâtiment IBS2
Campus EPN
6 rue Jules Horowitz - 38042 Grenoble

**Results of the N-terminal protein sequence analysis
of sample:**

LBLFR

Sequence run #7967C



Protein Sequence Determination

Amino acid sequence determination based on Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492 (s/n: 9510287J). Phenylthiohydantoin amino acid derivatives generated at each sequence cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems (software Procise PC v2.1). The PTH-amino acid standard kit (Perkin-Elmer P/N 4340968) was used and reconstituted according to the manufacturer's instructions (900776 Rev D). The procedures and reagents used were as recommended by the manufacturer. Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequence cycle. Retention times and integration values of peaks were compared to the chromatographic profile obtained for a standard mixture of derivatized amino acids.

Sequence run #7967C

Sequence found:

A D T I V A V E L D

in accordance with the sequence of the N-terminal end of Lectin alpha chain, from the first residue.

Sequence determination analyses were performed by J.-P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/UJF, Grenoble, France).



Jean-Pierre ANDRIEU

U. Anexo: Reporte de secuenciación del extremo amino terminal de LSBo-II

Institut de Biologie Structurale
Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré
Directrice : Nicole THIELENS



Grenoble, august 12th 2015

to: Annabelle VARROT
CERMAV-CNRS
BP 53
38041 Grenoble cedex 9, France

From: Jean-Pierre ANDRIEU
Institut de Biologie Structurale
Plateforme Seq3A : Séquençage et Analyse d'Acides Aminés
Groupe Réponse Immunitaire aux Pathogènes et au Soi Altéré
CEA/Grenoble/Bâtiment IBS2
Campus EPN
6 rue Jules Horowitz - 38042 Grenoble

**Results of the N-terminal protein sequence analysis
of sample:**

SBOLFR1

Sequence run #7969C



Protein Sequence Determination

Amino acid sequence determination based on Edman degradation was performed using an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 492 (s/n: 9510287J). Phenylthiohydantoin amino acid derivatives generated at each sequence cycle were identified and quantitated on-line with an Applied Biosystems Model 140C HPLC system using the data analysis system for protein sequencing from Applied Biosystems (software Procise PC v2.1). The PTH-amino acid standard kit (Perkin-Elmer P/N 4340968) was used and reconstituted according to the manufacturer's instructions (900776 Rev D). The procedures and reagents used were as recommended by the manufacturer. Chromatography was used to identify and quantify the derivatized amino acid removed at each sequence cycle. Retention times and integration values of peaks were compared to the chromatographic profile obtained for a standard mixture of derivatized amino acids.

Sequence run #7969C

Sequence found:

A D T I V A V E L D

in accordance with the sequence of the N-terminal end of Lectin alpha chain, from the first residue.

Sequence determination analyses were performed by J.-P. Andrieu (Institut de Biologie Structurale, CEA/CNRS/UJF, Grenoble, France).



Jean-Pierre ANDRIEU

Referencias

1. Abhilash J, Geethanandan K, Bharath SR, Sadasivan C, Haridas, M. The crystal structure of a lectin from *Butea monosperma*: insight into its glycosylation and binding of ligands. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 72:1376-83.
2. Akkouh O, Ng TB, Singh SS, Yin C, Dan X, Chan YS, Pan W, Cheung RCF. Lectins with Anti-HIV Activity: A Review. *Molecules.* 2015; 2: 648-68.
3. Aldana JC. Estudio de la actividad y concentración de la lectina en algunas subespecies de *Salvia bogotensis* y *Salvia rubescens* (*Labiatae*). Trabajo de grado, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 2000.
4. Alla AJ, Stine KJ. Development of monolithic column materials for the separation and analysis of glycans. *Chromatography.* 2015; 2:20-65
5. Almanza AM, Vega NA, Pérez G. Isolation and characterization of a lectin from *Galactia lindenii* seeds that recognizes blood group H determinants. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 492:180-90.
6. Alperin DM, Latter H, Lis H, Sharon N. Isolation, by affinity chromatography and gel filtration in 8 M-urea, of an active subunit from the anti-(blood-group A+N)-specific lectin of *Moluccella laevis*. *Biochem J.* 1992; 285 (1):1-4.
7. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215:403-10.
8. Ambrosi M, Cameron N, Davis B. Lectins: tools for the molecular understanding of glycode. *Org. Biomol. Chem.* 2005; 3:1593-608.
9. André S, Kaltner H, Manning JC, Murphy PV, Gabius HJ. Lectins: Getting Familiar with Translators of the Sugar Code. *Molecules.* 2015; 20: 1788-1823.

10. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(W1):W597-W603.
11. Azevedo-Moreira R, Lima I, Abreu JT, Souza B. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst: Oswaldo Cruz.* 1991; 86:211-8.
12. Babino A, Tello D, Rojas A, Bay S, Osinaga E, Alzari PM. The crystal structure of a plant lectin in complex with the Tn antigen. *FEBS Lett.* 2003; 536:106-10.
13. Baenziger JU, Fiete D. Structure of the Complex Oligosaccharides of Fetuin. *J. Biol. Chem.* 1979; 254 (3):789-95.
14. Banerjee R, Das K, Ravishankar R, Suguna K, Surolia A, Vijayan M. Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. *J. Mol. Biol.* 1996; 259:281–96.
15. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2006; 11:164-70.
16. Barre A, Bourne Y, Van Damme EJ. Mannose-binding plant lectins: different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. *Biochimie.* 2001; 83(7):645-51.
17. Barre A, Herve C, Lescure B, Rouge P. Lectin receptor kinases in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2002; 21:379-99.
18. Barroso-Neto IL, Delatorre P, Teixeira CS, Correia JLA, Cajazeiras JB, Pereira R, Nascimento KS, Laranjeira EPP, Pires AF, Assreuy AMS, Rocha BAM, Cavada BS. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016; 82:464-70

19. Barroso PT, Murcia HW, Vega NA, Pérez G. Obtención y purificación de IgY dirigidas contra la lectina de *Salvia bogotensis*. *Biomédica*. 2005; 25 (4):496-510.
20. Batista FAH, Goto LS, Garcia W, de Moraes DI, de Oliveira Neto M, Polikarpov I, Cominetti MR, Selistre-de-Araújo HS, Beltramini LM, Ulian Araújo AP. Camptosemin, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. *Eur. Biophys J*. 2010; 39 (8):1193-205.
21. Batista da Nóbrega R, Rocha BA, Gadelha CA, Santi-Gadelha T, Pires AF, Assreuy AM, Nascimento KS, Nagano CS, Sampaio AH, Cavada BS, Delatorre P. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. *Biochimie*. 2012; 94(3):900-6.
22. Becker JW, Reeke GN Jr, Wang JL, Cunningham BA, Edelman GM. The covalent and tridimensional structure of Concanavalina A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. *J. Biol. Chem*. 1975; 250:1513-24.
23. Bedair M, El Rassi Z. Affinity chromatography with monolithic capillary columns. II. Polymethacrylate monoliths with immobilized lectins for the separation of glycoconjugates by nano-liquid affinity chromatography. *J. Chromatogr A*. 2005; 1079 (1-2):236-45.
24. Benevides RG, Ganne G, Simoes RDC, Shubert V, Niemietz M, Unverzagt C, Chazalet V, Breton C, Varrot A, Cavada BS, Imberty A. A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. *J. Biol. Chem*. 2012; 287 (31):26352-64.
25. Berger EG. Tn-Syndrome. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis*. 1999; 1455 (2-3):255-68.
26. Bezerra BMJ, Velloso Fontenelle N, De Freitas A, Bezerra GA, Bezerra C, de Lima Alencara KL, Gomes Soares PM, Nascimento KS, Nagano CS, Martins JL, Gruber K, Holanda Sampaio A, Delatorre P, Rocha BAM, Sampaio Assreuy AM, Cavada BS.

- 19 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
4 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*
-

Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2013; 45:807-15.

27. Bezić N, Dunkić V, y Elma V. Antiphytoviral Activity of Essential Oils of Some Lamiaceae Species and Their Most Important Compounds on CMV and TMV. En Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Formatex Research Center, 2013.
28. Biemann K. Mass spectrometry of peptides and proteins. Annu. Rev. Biochem. 1992; 61:977-1010.
29. Bio-Rad. Aurum™ Total RNA Fatty & Fibrous tissue kit. Instruction manual. {En línea}. {23 de marzo de 2014} disponible en: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10001298.pdf>
30. Bird GWG, Wingham J. Hemagglutinins from *Salvia*. Vox Sang. 1974; 26:163-6.
31. Bird GWG, Wingham J. More *Salvia* agglutinins. Vox Sang. 1976; 30:217-9.
32. Bird GWG, Wingham J. Yet more *Salvia* agglutinins. Vox Sang. 1977; 32:121-2.
33. Bird GWG, Wingham J. Tn-specific lectins from *Lamium*. Clin. Lab. Haematol. 1981; 3:169-71.
34. Bird GWG, Wingham J. More Tn-specific lectins from seeds of genus *Labiatae*: *Hyptis* sp. Chan, *Salvia lyrata* and *Marrubium velutinum*. Clin. Lab. Haematol. 1982; 4 (4):403-4.
35. Bojarová P, Kren V. Sugared biomaterial binding lectins: achievements and perspectives. Biomater. Sci. 2016; 4:1142-60.
36. Bollag MD, Edelstein SJ, Stuart J. Isoelectric focusing (IFC). Protein Methods 4th ed. Wiley-Liss, New York. 1991; 162-74.

37. Borgert A, Heimbürg-Molinaro J, Song X, Lasanajak Y, Ju T, Liu M, Thompson P, Ragupathi G, Barany G, Smith DF, Cummings RD, Live D. Deciphering Structural Elements of Mucin Glycoprotein Recognition. ACS. Chem Biol. 2012; 7(6):1031-9.
38. Bowles DJ, Marcus SE, Pappin DJC, Findlay JBC, Eliopoulos E, Maycox PR, Burgess J. Posttranslational processing of Concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. J. Cell Biol. 1986; 102:1284-97.
39. Boyd WC, Reguera RM. Studies on the haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. J. Immunol. 1949; 62:333-9.
40. Boyd WC, Shapleigh E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). Science. 1954; 119:419.
41. Calvete JJ, Trole HH, Raida M, Urbanke C, Romero A, Grangeiro TB, Ramos MV, Almeida da Rocha MI, Guimara FN, Cavada BS. Molecular characterization and crystallization of *Diocleinae* lectins. Biochim. Biophys. Acta. 1999; 1430:367-75.
42. Cao Y, Stoschek P, Springer GF, Karsten U. Thomsen- Friedenreich related carbohydrate Antigen in normal adult human tissue: A systematic and comparative study. Histochem. Cell Biol. 1996; 106 (2):197-207.
43. Cartron JP, Andreau G, Cartron J, Bird GWG, Salmon C, Gerbal A. Demonstration of T-transferase deficiency in Tn-polyagglutinable blood samples. Eur. J. Biochem. 1978; 92 (1):111-9.
44. Carreño N, Quintero M, Reyes Guzmán EA, Reyes EA, Vega NA. Aminosequence for H-type II specific lectin from *Galactia lindenii* seeds and production of recombinant lectin in a bacterial system. International Carbohydrates Symposium. 2016. New Orleans (USA).
45. Carvajal DG. Optimización de las características físicas y químicas del puré de manzana (*Malus domestica*) para la extracción de su esencia. Trabajo de grado, Zamorano (Honduras); 2007.

46. Casas ZY, Montaña EA, Vega NA. Lectinas con dominio de Leguminosa: características estructurales y utilidad como agentes insectistáticos e insecticidas. Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia. 2016a; 32(2):157-69.
47. Casas ZY, Quintero M, Reyes EA, Vega NA. Isolation and characterization of novel lectin from *Galactia lindenii* seeds. International Carbohydrates Symposium. 2016b. New Orleans (USA).
48. Cavada BS, Santos FC, Grangeiro TB, Nunes EP, Sales PVP, Ramos RL, de Sousa FAM, Crisostomo CV, Calvete JJ. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. Phytochemistry. 1998; 49:675-80.
49. Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro T, Barral-Netto M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in Biological Activity? Lessons from and potential Biotechnological Uses of the *Diocleinae* Subtribu lectins. Curr. Protein Pept. Sci. 2001; 2:123-35.
50. Cavada BS, Marinho E, Souza E, Benevides R, Delatorre P, Souza L, Nascimento KS, Sampaio A, Moreno F, Rustigel J, Canduri F, Azevedo W, Debray H. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. Acta Cryst. 2006; F62:235-7.
51. Cavalcante TTA, Firmino NS, Tajra FS, De Andrade CR, Costa RA. Plant lectins as alternative tools against bacterial biofilms. Afr. J. Microbiol. Res. 2014; 8(27):2555-64.
52. Cazet A, Julien S, Bobowski M, Burchell J, Delannoy P. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. Breast Cancer Res. 2010; 12:204.
53. Cipolla L, Peri F, Airoidi C. Glycoconjugates in Cancer Therapy. Anti-Cancer Agents Med. Chem. 2008; 8(1):92-121.

54. Connolly J, Larsson H, Openshaw M, Barnes A. Improved confidence in protein identification using Mascot via peptide SPITC derivatization: Shimadzu application note. 2005.
55. Considine T, Patel H, Singh H, Creamer L. Influence of binding of sodium dodecyl sulphate, all trans retinol, palmitate and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate on the heat-induced unfolding and aggregation of β -lactoglobulin. B.J. Agric. Food.Chem.2005533197-205.
56. Cortázar TM, Reyes EA, Vega NA. Differential agglutination from *Dioclea grandiflora* lectins on red blood cells. International Carbohydrates Symposium. 2016. New Orleans (USA).
57. Creighton TE. Protein structure. A practical approach. IRL Press, Oxford. 1995:157.
58. Dahiya R, Itzkowitz SH, Byrd JC, Kim YS. Mucin oligosaccharide biosynthesis in human colonic cancerous tissues and cell lines. Cancer. 1992; 70 (6):1467-76.
59. Da Nóbrega RB, Rocha BAM, Gadelha CAA, Santi-Gadelha T, Pires AF, Assreuy AMS, Nascimento KS, Nagano CS, Sampaio AH, Cavada BS, Delatorre P. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. Biochimie. 2012; 94:900-6.
60. Dam TK, Oscarson S, Sacchettini JC, Brewer CF. Differential solvation of "core" trimannoside complexes of the *Dioclea grandiflora* lectin and Concanavalin A detected by primary solvent isotope effects in isothermal titration microcalorimetry. J. Biol. Chem. 1998a; 273:32826–32.
61. Dam TK, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamics of binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea grandiflora* lectin. J Biol Chem, 1998b; 273:32812–7.

62. Dam TK, Roy R, Das SK, Oscarson S, Brewer CF. Binding of Multivalent Carbohydrates to Concanavalin A and Dioclea grandiflora Lectin. Thermodynamic analysis of the “multivalency effect” J. Biol. Chem. 2000; 275 (19):14223-30.
63. Dam TK, Gerken TA, Cavada BS, Nascimento KS, Moura TR, Brewer CF. Binding Studies of -GalNAc-specific Lectins to the -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. J. Biol. Chem. 2007; 282 (38):28256-63.
64. Dam TK, Cavada BS, Nagano CS, Rocha BAM, Benevides RG, Nascimento KS, de Sousa LAG, Oscarson S, Brewer CF. Fine specificities of two lectins from *Cymbosema roseum* seeds: a lectin specific for high-mannose oligosaccharides and a lectin specific for blood group H type II trisaccharide. Glycobiology. 2011; 21 (7):925-33.
65. Dan X, Liu W, Ng TB. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. Med. Res. Rev. 2015; 0(0):1–27.
66. Dan X, Ng TB. Two legume defense proteins suppress the mobility of nasopharyngeal carcinoma cells. J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2016; 31(6):1328-34.
67. Dang L, Van Damme EJM. Review: Toxic proteins in plants. Phytochemistry. 2015; 117:51–64.
68. Das SS. In-house preparation of lectin panel and detection of Tn polyagglutination. Asian. J. Transfus. Sci. 2015; 9(1):102–3.
69. Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. Specificity of Twelve Lectins Towards Oligosaccharides and Glycopeptides Related to N-Glycosylproteins. Eur. J. Biochem. 1981; 117:41 -55.
70. Delatorre P, Rocha BAM, Simões RC, Pereira-Júnior FN, Silva HC, Bezerra EHS, Bezerra MJB, Marinho ES, Gadelha CAA, Santi-Gadelha T, Farias DL, Assreuy AMS, Marques-Domingos GFO, Nagano CS, Cavada BS. Mass Spectrometry and X-ray

- Diffraction Analysis of Two Crystal Types of *Dioclea virgata* Lectin: An Antinociceptive Protein Candidate to Structure/Function Analysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011; 164:741-54.
71. de Queiroz LP, Pastore JFB, Cardoso D, Snak C, de C Lima AL, Gagnon E, Vatanparast M, Holland AE, Egan AN. A multilocus phylogenetic analysis reveals the monophyly of a recircumscribed papilionoid legume tribe *Diocleae* with well-supported generic relationships. *Mol Phylogenet Evol.* 2015; 90:1-19.
72. de Schutter K, Van Damme EJM. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. *Molecules.* 2015; 20:9029-53.
73. de Souza GA, Oliveira PS, Trapani S, Santos AC, Rosa JC, Laure HJ, Faca VM, Correia MT, Tavares GA, Oliva G, Coelho LC, Greene LJ. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology.* 2003; 13 (12):961-972.
74. de Vasconcelos MA, Alves AC, Carneiro RF, Sampaio Dias AH, Viana Martins FW, Batista Cajazeiras J, Nagano CS, Holanda Teixeira E, do Nascimento KS, Cavada BS. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 81:600–7.
75. Duk M, Mitra D, Lisowska E, Kabat EA, Sharon N, Lis H. Immunochemical studies on the combining site of the A+N blood type specific *Moluccella laevis* lectin. *Carbohydr. Res.* 1992; 236:245-58.
76. Elfstrand M. Über blutkörperchenagglutinierende Eiweisse. *Görberdorfer Veröffentlichungen a. Band I: Kobert, R. ed.* 1898:1-159. Alemania.
77. Elgavish S, Shaanan B. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono- and disaccharides. *J. Mol. Biol.* 1998; 277:917-32.
78. Etzler ME, Macmillan S, Scates S, Gibson DM, James DW, Cole D, Thayer S. Subcellular Localizations of Two *Dolichos biflorus* Lectins. *Plant Physiol.* 1984; 76(4):871-8.

79. Fernández-Alonso JL. Una nueva especie de *Salvia* (*Labiatae*) de Colombia. Anales Jard. Bot. Madrid. 1995a; 52 (2):159-62.
80. Fernández-Alonso JL. Estudios en *Labiatae* de Colombia, novedades en los géneros *Salvia* e *Hyptis*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 1995b; 19 (74):469-80.
81. Fernández-Alonso JL. Estudios en *Labiatae* de Colombia II. Novedades en *Salvia* sect. Longipes Epl. Anales Jard. Bot. Madrid. 1995c; 53 (1):41-6.
82. Fernández-Alonso JL, Vega NA, Filgueira JJ, Pérez G. Lectin prospecting in Colombian *Labiatae*. A systematic ecological approach. Biochem. Syst. Ecol. 2003; 31:617-33.
83. Fernández-Alonso JL. Estudios en *Labiatae* VII. *Salvia yukoyukparum*, Nueva Especie y Primer Representante de la Sección *Tomentellae* en Colombia. Novon. 2008; 18 (1):38-42.
84. Fernández-Alonso JL, Vega NA, Pérez G. Lectin prospecting in Colombian *Labiatae*. A systematic ecological approach- III. Mainly exotic species (cultivated or naturalised). Caldasia. 2009; 31 (2):227-45.
85. Fernández-Alonso JL. *Salvia guacana*, una nueva *Labiatae* de Colombia con flores resupinadas y sinopsis de *Salvia* sect. *Tubiflorae*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2012; 37(141):517-33.
86. Filgueira JJ. Purificación, caracterización y análisis estructural preliminar de las lectinas presentes en *Salvia palifolia* e *Hyptis mutabilis*. Tesis Doctoral en Química: Universidad Nacional; 2002.
87. Filgueira JJ, Pérez G. Tn specific lectins production from *Salvia palifolia* and *Hyptis mutabilis* by celular somaclonal variation. Revista Fac. Ciencias B. 2013; 9 (1):134-41.
88. Freire T, Osinaga E. Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. Inmunología. 2003; 22(1):27-38.

89. Fuqua JL, Hamorsky K, Matoba N, Palmers KE. Bulk production of the antiviral lectin griffithsin. *Plant Biotech. J.* 2015; 13: 1160–8.
90. Gabius HJ, Gabius S, editores. *Glycosciences. Status and perspectives.* Londres: Chapman and Hall; 1997.
91. Gabius HJ. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften.* 2000; 87 (3):108-21.
92. Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 2002; 1572 (2-3):165-77.
93. Galili U, Ávila JL (Eds.). α -Gal and anti.Gal α 1,3-Galactosyltransferase, α -Gal Epitopes, and the Natural Anti-Gal Antibody subcellular Biochemistry. Vol 23. Springer Science+Business Media. New York. 1999.
94. García Triana BE, Soto OD, Lavandero Espina AM, Saldaña Bernabeu A. Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Rev. Haban. Cienc. Med.* 2012; 11 (4):450-6.
95. GE Healthcare Bio-Sciences AB. ECH Sepharose™ 4B. General Electric Company; 2006. Instruction 71-7093-00 AD.
96. GE Healthcare Bio-Sciences AB. CNBr-activated Sepharose™ 4B. General Electric Company; 2009. Instruction 71-7086-00 AF.
97. GE Healthcare Bio-Sciences AB. NHS-activated Sepharose™ 4 Fast Flow. General Electric Company; 2011. Instruction 71-5000-14 AD.
98. Geethanandan K, Abhilash J, Bharath SR, Sadasivan C, Haridas M. X-ray structure of a galactose-specific lectin from *Spatholobous parviflorous*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2011; 49: 992-8.

99. Ghazarian H., Idoni B., Oppenheimer S. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics". *Acta histochem.* 2011; 113:236–47.
100. Gilboa E, Mitra SW, Goff S, Baltimore D. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell.* 1979; 18(1):93-100.
101. Goldstein IJ, Poretz RD. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. En: *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (IE Liener, N. Sharon, IJ Goldstein Eds.). Elsevier. 2012; 233-47.
102. Gorakshakar AC, Ghosh K. Use of lectins in immunohematology. *Asian J. Transfus. Sci.* 2016; 10(1):12–21.
103. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R. *A new bioinformatics analysis tools framework.* *Nucleic Acids Res.* 2010; (38) Suppl:W695-9.
104. Gourdine JP, Markiv A, Smith-Ravin J. The three dimensional structure of codakine and related marine C-type lectins. *Fish Shellfish Immunol.* 2007; 23 (4):831-9.
105. Grangeiro TB, Schriefer A, Calvete JJ, Raida M, Urbanke C, Barral-Netto M, Cavada BS. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur. J. Biochem.* 1997; 248 (1):43-48.
106. Graves B, Crowther RL, Chandran C, Rumberger JM, Li S, Huang KS, Presky DH, Familletti PC, Wolitzky BA, Burns DK. Insight into E-selectin/ligand interaction from the crystal structure and mutagenesis of the lec/EFG domains. *Nature.* 1994; 367 (6463):532-8.
107. Green Ch. The ABO, Lewis and related blood group antigens; a review of structure and biosynthesis. *FEMS Microbiol Immunol.* 1989; 1(6-7):321-30.
108. Gross E, Witkop B. Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: The methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 1962; 237:1856-60.

109. Haji-Ghassemi O, Gilbert M, Spence J, Schur MJ, Parker MJ, Jenkins ML, Burke JE, van Faassen H, Young NM, Evans SV. Molecular Basis for Recognition of the Cancer Glycobiomarker, LacdiNAc (GalNAc[beta1-4]GlcNAc), by *Wisteria floribunda* Agglutinin. *J.Biol.Chem.* 2016; 291:24085-95.

110. Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 1996; 56:5309-18.

111. Hamako J, Suzuki Y, Hayashi N, Kimura M, Ozeki Y, Hashimoto K, Matsui T. Amino acid sequence and characterization of C-type lectin purified from the snake venom of *Crotalus ruber*. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* 2007; 146 (3):299-306.

112. Hardman KD, Ainsworth CF. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1972; 11:4910-9.

113. Havea P, Carr A, Creamer L. The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat induced whey protein gels. *J.Dairy Res.* 2004; 71 (3): 330-9.

114. Hendricks HGCJM, Koninkx JFJG, Draaijer M, Dijk JE, Raaijmakers JAM, Mouwen JMVM. Quantitative determination of the lectin binding capacity of small intestinal brush-border membrane. An enzyme linked lectin sorbent assay (ELLSA). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* 1987; 905 (2):371-5.

115. Herman EM, Shannon LM, Chrispeels MJ. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. *Planta.* 1985; 165:23-9.

116. Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK. Immobilized affinity ligand techniques. Academic Press, INC., San Diego. 1992; 53-4, 69, 74-5, 88, 253-4.

117. Hernández P, Pérez E, Martínez L, Ortíz B. Martínez G. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB. 2005; 24 (1):21-7.
118. Herrick HE, Lawrence JM, Coharan DR. Simple methods for determination of methionine and cysteine in legume seeds. Anal. Biochem. 1972; 48 (2):253-64.
119. Hirabayashi J, Kasai K. Separation technologies for glycomics. J. Chromatogr. B. 2002; 771 (1-2):67-87.
120. Hirabayashi J. Oligosaccharide microarrays for glycomics. Trends Biotechnol. 2003; 21 (4):141-3.
121. Hirabayashi J, Kuno A, Tateno H. Development and applications of the lectin microarray. Top Curr. Chem. 2015; 367:105-24.
122. Hirohashi S, Clausen H, Yamada T, Shimosato Y, Hakomori H. Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC Lu-35 and 81 expressed in cancer of blood group O or B individuals. Its identification as "Tn antigen". Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A. 1985; 82 (20):7039-43.
123. Hirs CH, Stein WH, Moore S. Peptides obtained by chymotryptic Hydrolysis of performic acid oxidized ribonuclease. J. Biol. Chem. 1956; 221 (1):151-69.
124. Hu D, Tateno H, Hirabayashi J. Lectin Engineering, a Molecular Evolutionary Approach to Expanding the Lectin Utilities. Molecules. 2015; 20:7637-56.
125. Huang C, Zhang X, Lin Q, Xu X, Hew CL. Characterization of a novel envelope protein (VP281) of shrimp white spot syndrome virus by mass spectrometry. J. Gen. Virol. 2002; 83 (Pt 10):2385-92.
126. Ibrahim A, Aquel AA. Effect of *Salvia triloba* L.f. Extracts on Neoplastic Cell lines. J. J. B. S. 2010; 3 (2):69-76.

127. Imoto T, Yamada H. Chemical modification. In Creighton T. editores. Protein function. IRL Press, Oxford; 1989:263.
128. Invitrogen. Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit, mRNA isolation for RT-PCR amplification. Invitrogen, Dynal Handbook; 2007. Cat. no. 610.21.
129. Jeyaprakash AA, Rani PG, Reddy GB, Banumathi S, Betzel C, Surolia A, Vijayan M. Crystal structure of the jacaline-T-antigen complex and comparative study of lectin T-antigen complexes. 2002; J. Mol. Biol. 321:637-45.
130. Jiang SY, Ma Z, Ramachandran S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. BMC Evol. Biol. 2010; 10:79.
131. Jiménez S. Obtención y caracterización parcial de las subunidades de la lectina Tn específica de *Salvia bogotensis*. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias - Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia; 2000.
132. Ju T, Otto VI, Cummings RD. The Tn Antigen—Structural Simplicity and Biological Complexity. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2011; 50(8):1770-91.
133. Ju T, Wang Y, Aryal RP, Lehoux S D, Ding X, Kudelka MR, Heimbürg-Molinaro J. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. Proteomics-Clinical Applications, 2013; 7(9-10):618-31.
134. Juge N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. Trends in Microbiol, 2012; 20 (1):30-9.
135. Julien S, Videira PA, Delannoy P. Sialyl-Tn in Cancer: (How) Did We Miss the Target? Biomolecules. 2012; 2:435-66.
136. Kanev MO, Bakar E. Glycoconjugates in cancer. J. Health Sci. KOU. 2016; 2 (1):1-5.
137. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. Cancer Sci. 2004; 95 (5):377-84.

138. Kamatou GP, Makunga NP, Ramogola WP, Vijoer AM. South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 119 (3):664-72.
139. Kamitani Y, Kajii E, Suda T, Ikemoto S. Expression of the Tn antigen on erythroid cells from a patient with Tn syndrome. *Jpn. J. Hum. Genet.* 1992; 37 (4):271–83.
140. Karlsson NG, Nordman H, Karlsson H, Carlstedt I, Hansson GC. Glycosylation differences between pig gastric mucin populations: a comparative study of the neutral oligosaccharides using mass spectrometry. *Biochem. J.* 1997; 326:911-7.
141. Kasai K. Frontal affinity chromatography: A unique research tool for biospecific interaction that promotes glycobiology. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 2014; 90(7):215-34.
142. Kishikawa T, Ghazizadeh M, Sasaki Y, Springer GF. Specific role of T and Tn tumor-associated antigens in adhesion between a human breast carcinoma cell line and normal human breast epithelial cell line. *Jpn. J. Cancer. Res.* 1999; 90 (3):326-32.
143. Kong KH, Hong SG, Yoo SY, Lee KS, Kim HH. Cloning, expression and characterization of novel lectin from *Oryza sativa*. *J. Food Biochem.* 2004; 28 (6):500-12.
144. Krug MS, Berger SL. First strand cDNA synthesis primed with oligo (dT). *Methods Enzymol.* 1987; 152:316-25.
145. Kudelka MR, Ju T, Heimbürg-Molinario J, Cummings RD. Simple sugars to complex disease— mucin-type O-glycans in cancer. *Adv. Cancer Res.* 2015; 126:53–135.
146. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, Yamada M, Hirabayashi J. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat. Methods.* 2005; 2 (11):851-6.

147. Kuno A, Matsuda A, Ikehara Y, Narimatsu H, Hirabayashi J. Chapter Seven- Differential glycan profiling by lectin microarray targeting tissues specimens. *Methods Enzymol.* 2010; 478:165-79.
148. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259):680-5.
149. Landsteiner K, Raubitschek H. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.* 1907; 45,600-7.
150. Lannoo N, Van Damme EJM. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci.* 2014; 5:397.
151. Lee LT, Frank S, de Jongh DS, Howe C. Immunochemical studies on Tn erythrocytes glycoprotein. *Blood.* 1981; 58 (6):1228-31.
152. Lee TD, Shively JE. Enzymatic and chemical digestion of proteins for Mass Spectrometry. *Methods Enzymol.* 1990; 193:361-74.
153. Lee X, Thompson A, Zhiming Z, Ton-That H, Biesterfeldt J, Ogata C, Xu L, Johnston RAZ, Young NM. Structure of the complex of *Maclura pomifera* agglutinin and the T-antigen disaccharide Gal β 1-3 GalNAc. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:6312-8.
154. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol.* 1996; 6(3):402-6.
155. Liao DI, Kapadia G, Ahmed H, Vasta GR, Herzberg O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate-galactoside-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91 (4):1428-32.
156. Lima TE, Sartori ALB, Rodrigues MLM. Plant antiherbivore defenses in *Fabaceae* species of the Chaco. *Braz. J. Biol.* 2016; In press.

157. Limpias C, Pérez G, Acosta J, Vega N, Ricaurte O. Detección del antígeno Tn en tumores epiteliales con la lectina de *Vicia villosa* isolectina B₄. Rev.Fac.Med. 2010; 58: 293-305.
158. Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. Annu. Rev. Biochem. 1986; 55:35-67.
159. Lis H, Latter H, Adar R, Sharon N. Isolation of two blood type A and N specific isolectins from *Moluccella laevis* seeds. FEBS. Lett. 1988; 233:191–5.
160. Lis H, Sharon N. *Moluccella laevis* lectin - An unusual protein with a unique specificity. Trends Glycosci. Glycotechnol. 1994; 6:65-74.
161. Lisowska E. Tn Antigens and their significance in Oncology. Acta Biochim. Pol. 1995; 42 (1):11-7.
162. Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. Methods Enzymol. 1974; 31:528-44.
163. Lopes-Sousa B, Silva-Filho JC, Kumar P, Graewert MA, Pereira RI, Lyskowski A, Matias-Rocha BA, Delatorre P, Arruda-Bezerra G, Nagano CS, Gruber K, Cavada BS. High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2015; 59:103-10.
164. Lopes-Sousa B, Silva-Filho JC, Kumar P, Graewert MA, Pereira RI, Cunha RM, Nascimento KS, Bezerra GA, Delatorre P, Djinovic-Carugo K, Nagano CS, Gruber K, Cavada BS. Int. Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: A new tool for cancer research. J. Biochem. Cell Biol. 2016; 72:27-39.
165. Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. Review: Legume lectin structure. BBA-Proteins Proteomics. 1998; 1383 (1):9-36.

166. Loris R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 2002; 1572 (2-3):198-208.
167. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N. The Purification, Composition, and Specificity of the Anti-T Lectin from Peanut (*Arachis hypogaea*). *J. Biol. Chem.* 1975; 250:8518-23.
168. Macedo MLR, Oliveira CFR, Oliveira CT. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules.* 2015; 20:2014-33.
169. Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Gomes YM, Coelho LCBB, Correia MTS. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals.* 2004; 32:57-60.
170. Macherey-Nagel. RNA isolation from plant. User manual NucleoSpin® RNA Plant; 2011.
171. Mákela O. Studies on hemagglutinins of Leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.* 1957; 35 (Supl 11):1-156.
172. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 2001; 70:437-473.
173. Martin HJ, Breyer-Pfaff U, Wosol V, Venz S, Block S, Maser E. Purification and characterization of AKR1B10 from human liver: Role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug. Metab. Dispos.* 2006; 34 (3), 464-70.
174. Martínez M, Córdoba F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2000; 30:199-208.
175. Martínez P. Estudio de las interacciones entre Vicilina y las lectinas Con A y CEL-II de la semilla de *Canavalia ensiformis*. Tesis Doctoral en Química: Universidad Nacional de Colombia; 2009.

176. Matsudaira P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 1987; 262 (21):10035-8.
177. Matsuda A, Kuno A, Ishida H, Kawamoto T, Shoda J, Hirabayashi J. Development of an all in-one technology for glycans profiling targeting formalin-embedded tissue sections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 370 (2):259-263.
178. Medeiros A, Bianchi S, Calvete JJ, Balter H, Bay S, Robles A, Cantacuzène D, Nimitz M, Alzari PM, Osinaga E. Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267 (5):1434-40.
179. Melgarejo LM, Pérez G. Immunolocalization of the lectins p2 Y p4 from *Dioclea lehmanni* seeds. *Plant Cell. Physiol.* 1997; 38(4):480-3.
180. Melgarejo LM, Vega NA, Pérez G. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. seeds. *Braz. J. Plant Physiol.* 2005; 17 (3):315-24.
181. Micucci HO, Camps E. Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. *Acta Farm. Bonaerense.* 1987; 6 (1):35-54.
182. Mishra V, Sharma RS, Yadav S, Babu CR, Singh TP. Purification and characterization of four isoforms of Himalayan mistletoe ribosome-inactivating protein from *Viscum album* having unique sugar affinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 423:288-301.
183. Mislovicová D, Gemeiner P, Kozarova A, Kozár T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. *Biologia.* 2009; 64 (1):1-19.
184. Moreira RDA, Perrone JC. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 1977; 59:783-87.

185. Munkley J. Review: The role of Sialyl-Tn en Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(3):275.
186. Naeem A, Hasan KR, Vikram H, Akif M. Purification of *Cajanus cajan* Root Lectin and its interaction Lipopolysaccharide as Studied by Different Spectroscopic Techniques. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 396:99-105.
187. Nagano CS. Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y vegetales superiores. Tesis Doctoral en Bioquímica y Biología Molecular; Universidad de Valencia, 2007.
188. Nagano CS, Calvete JJ, Baretino D, Perez A, Cavada BS, Sanz L. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. *Biochem. J.* 2008. 409 (2):417-28.
189. Navarro Y, Pérez G. Normalización del método de migración capilar para evaluar eritroaglutinación. *Rev. Colomb. Quím.* 1978; 8:15-23.
190. Nakamura-Tsuruta S, Uchiyama N, Kominami J, Hirabayashi J. Lectins: Analytical Technologies. Nilsson CL, editor; 2007:239-66.
191. Naismith JH, Field RA. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (2):972-6.
192. Nascimento KS, Cunha AI, Nascimento KS, Cavada BS, Azevedo AM, Aires- Barros MR. An overview of lectins purification strategies. *J. Mol. Recognit.* 2012; 25:527-41.
193. Nilsson CL ed. *Lectins Analytical Technologies*. Elsevier, Amsterdam.2007.
194. Nishiya Y, Nakano S. Screening of enzyme stabilizers using thermal shift assays on the basis of structural informations. *Int J Anal Bio-Sci.* 2014; 2 (2):58-63.

195. Nishiyama T, Matsumoto Y, Watanabe H, Fujiware M, Sato S. Detection of Tn antigen with *Vicia villosa* agglutinin in urinary bladder cancer: It's relevance to the patient's clinical course. J. Natl. Cancer Inst. 1987; 78:1113-25.
196. O'Donoghue M, Allard P, Ferlinz A, Verheyde J, Warrington K, Nhiri N, Jaquet E. Protein thermal shift assay using applied biosystems real time PCR systems. Life Technologies corporation, Applied biosystems. 2009.
197. Oliveira JTA, Cavada BS, Moreira RA. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. Rev. Bras. Bot. 1991; 14 (1):61-6.
198. Olmstead, RG. A synoptical classification of the Lamiales, version 2.4. 2016. Disponible en: <http://depts.washington.edu/phylo/Classification.pdf>. (Consultada 31 de octubre de 2016).
199. Olson MO, Liener IE. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of the jack bean. Biochemistry. 1967; 6:105-11.
200. Osinaga E, Bay S, Tello D, Babino A, Pritsch O, Assemat K, Cantacuzene D, Nakada H, Alzari P. Analysis of the fine specificity of Tn-binding proteins using synthetic glycopeptide epitopes and a biosensor based on surface plasmon resonance spectroscopy. FEBS Letter, 2000; 469 (1):24-8.
201. Osterne VJ, Santiago MQ, Pinto-Junior VR, Cajazeiras JB, Correia JL, Leitão CC, Carneiro RF, Pereira-Junior FN, Vasconcelos MA, Rocha BA, Assreuy AM, Bringel PH, Nagano CS, Nascimento KS, Cavada BS. Purification, partial characterization and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. Appl. Biochem. Biotechnol. 2014; 172(7):3342-53.
202. Patanjali SR, Sajjan U, Surolia A. Erythrocyte-binding studies on an acidic lectin from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*). J. Biochem. 1988; 252:625-31.

203. Pérez G, Hernández M, Mora E. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. *Phytochemistry*. 1990; 29:1745-9.
204. Pérez G, Pérez C, Sousa-Cavada B, Moreira R, Richardson M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. *Phytochemistry*. 1991; 30 (8):2619-21.
205. Pérez G. *Erythrina* lectins: Structural and physico-chemical properties: A review. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 1993; 18:545-53.
206. Pérez G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmannii* (*Fabaceae*) seeds. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30:843-53.
207. Pérez G, Vega NA, Fernández-Alonso JL. Lectin prospecting in Colombian *Labiatae*. A systematic ecological approach-II. *Caldasia*. 2006; 28:179-95.
208. Pérez G, Vega N. Lamiaceae lectins. *Functional Plant. Sci. Biotechnology*. 2007; 1(2): 288-99
209. Pérez-Giménez J, Mongiardini EJ, Althabegoiti MJ, Covelli J, Quelas JI, López-García SL, Lodeiro AR. Soybean Lectin Enhances Biofilm Formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the Absence of Plants. *Int. J. Microbiol.* 2009; 2009:719367.
210. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004; 25(13):1605-12.
211. Peumans W, Van Damme EJM. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1998; 15:199-228.
212. Picknett T, Brenner S. Reverse Transcription. *Encyclopedia of Genetics*; 2003:1711.
213. Piller V, Piller F, Cartron JP. Isolation and characterization of N-acetylgalactosamine specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. *J. Biol. Chem.* 1986; 261 (30):14069-75.

21 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
4 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

214. Piller V, Piller F, Fukuda M. Biosynthesis on truncated O-glycans in the T cell line Jurkat. Localization of O-glycan initiation. J. Biol. Chem. 1990a; 265 (16):9264-71.
215. Piller V, Piller F, Cartron JP. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. Eur. J. Biochem. 1990b; 191 (2):461-6.
216. Pinho SS, Reis CA. Glycosilation in cancer: Mechanisms and clinical implications. Nat. Rev. Cancer. 2015; 15:540-55.
217. Pohleven J, Štrukelj B, Kos J. Affinity Chromatography of Lectins, Affinity Chromatography. Dr. Sameh Magdeldin (Ed.) InTech, Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/carbohydrate-affinity-chromatography>
218. Puri K, Gopalakrishnan B, Surolia A. Carbohydrate binding specificity of the Tn-antigen binding lectin from *Vicia villosa* seeds (VVLB₄). FEBS Lett. 1992; 312:208-12.
219. Pusztai A. Plant lectins. Cambridge University Press; 1991:263.
220. Quintero M, Reyes Montaña E, Pérez G, Vega N. Expression of two types *Diocleinae* Subtribe Lectins. 17th European Carbohydrate Symposium (Eurocarb 17) 2013. Tel-Aviv (Israel). Abstracts book, 67.
221. Quintero M. Elucidación parcial de la estructura primaria de la lectina LGL-P2 y purificación y caracterización parcial de la lectina LGL-P4 presentes en semillas de *Galactia lindenii*. Trabajo de grado de Maestría, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
222. Quintero S. Obtención a nivel preparativo y determinación de algunas propiedades de la lectina presente en la semilla de *Lepechinia bullata*. Trabajo de grado, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 2006.

223. Raja I, Rajendran K, Kumariah M, Rajasekaran S. Isolation and characterization of mannose-binding lectin gene from leaves of *Allium ascalonicum* (Shallot) and its putative role in insect resistance. SIJBS. 2016; 2(2):245-55.
224. Ramos MV, Moreira R de A, Oliveira JT, Cavada BS, Rougé P. The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1996; 91(6):761-6.
225. Rapoport EM, Kurmyshkina OV, Bovin NV. Mammalian Galectins: Structure, Carbohydrate Specificity, and Functions. Biochem. (Moscow). 2008; 73(4):393-405
226. Ravishankar R, Ravindran M, Suguna K, Surolia A, Vijayan M. Crystal structure of the peanut lectin – T-antigen complex. Carbohydrate specificity generated by wather bridges. Curr. Sci. 1997; 72:855-61.
227. Rep M, Dekker HL, Vossen HJ, De Boer AD, Houterman PM, Speijer D, Back JW, De Koster CG, Cornelissen BJ. Mass spectrometry identification of isoforms of PR proteins in xylem sap fungus-infected tomato. Plant Physiol. 2002; 130 (2):904-17.
228. Rinderle SJ, Goldstein IJ, Matta KL, Ratcliffe RM. Isolation and characterization of Amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or Cryptic T)-antigen. J. Biol. Chem. 1989; 264:16123-31.
229. Rini JM. Lectin Structure. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 1995; 24:551-77.
230. Rocha BAM, Nagano CS, Delatorre P, Calvete JJ, Cavada BS. Primary sequencing of CRLII by Edman's degradation and tándem mass spectrometry. UniProtKB. 2010.
231. Robles A, Medeiros A, Berois N, Balter HS, Pauwels EK, Osinaga E. In site interaction evaluation of Tn density by inhibition assays. Nuclear Medicine and Biology. 2010; 37:453-8.
232. Rogers DJ, Loveless RW. Haemagglutinins of the *Phaeophyceae* and non-specific aggregation phenomena by polyphenols. Bot. Marina. 1985; 28(4):133-8.

233. Rojas J. Extracción, purificación y caracterización parcial de la lectina presente en las semillas de *Lepechinia bullata*. Trabajo de grado, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
234. Rougé P, Peumans WJ, Van Damme EJM, Barre A, Singh T, Wu JH, Wu AM. Structure-function relationships of plant lectins that specifically recognize T and Tn antigens. Wu AM (Ed). En *The molecular Immunology of complex carbohydrates*, 3rd ed. Springer. 2011; 157-70.
235. Roxby DJ, Pfeiffer MB, Morley AA, Kirkland MA. Expression of the Tn antigen in myelodysplasia, lymphoma and leukemia. *Transfusion*. 1992; 32 (9):834-8.
236. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc*. 2010; 5:725-38.
237. Rüdiger H, Gabius HJ. The history of lectinology. *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*; Gabius HJ. Ed. Wiley-VCH: Weinheim, Germany. 2009; 261–8.
238. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239 (4839):487-491.
239. Sanabria E. Aislamiento, purificación y caracterización parcial de la lectina presente en las semillas de *Lepechinia bullata*. Trabajo de grado, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 1999.
240. Sánchez M. Estandarización de las condiciones de separación de las subunidades que constituyen las lectinas presentes en las semillas de *Salvia bogotensis*. Trabajo de grado, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 2003.
241. Santana SS, Gennari-Cardoso ML, Carvalho FC, Roque-Barreira MC, Santiago AdS, Alvim FC, Pirovani CP. Eutirocalli, a RIP-2 Type Lectin from the latex of

- Euphorbia tirucalli* L. Presents Proinflammatory Properties. PLoS ONE. 2014; 9(2):e88422.
242. Santos AFS, da Silva MDC, Paiva PMG, Correia MTS, Coelho LCBB. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. Current Topics in Peptide & Protein Research. 2014; 15:41-62.
243. Sarkar M, Wu AM, Kabat EA. Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. Arch. Biochem. Biophys. 1981; 209:204-18.
244. Sartim MA, Sampaio SV. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 2015; 21:35.
245. Sastry MVK, Benerjee P, Patanjali SR, Swamy MJ, Swarnalatha GV, Surolia A. Analysis of Saccharide Binding to *Artocarpus integrifolia* Lectin Reveals Specific Recognition of T-antigen (β D-Gal(1-3)D-GalNAc. J. Biol. Chem. 1986; 261:11726-33.
246. Satomaa T, Heiskanen A, Leonardsson I, Angstrom J, Olonene A, Blomqvist M, Saluvuori N, Haglund C, Teneberg S, Natunen J, Carpén O, Saarinen J. Analysis of the Human Cancer Glycome Identifies a Novel Group of Tumor-Associated N-Acetylglucosamine Glycan Antigens. Cancer Res. 2009; 69:5811-9.
247. Schagger H, Von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 1987; 166 (2):368-79.
248. Semisotnov GV, Rodionova NA, Razgulyaev OI, Uversky VN, Gripas AF, Gilmanshin RI. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*. 1991; 31(1):119–28.
249. Senear DF, Teller DC. Thermodynamics of concanavalin A dimer-tetramer self-association: sedimentation equilibrium studies. Biochemistry. 1981; 20:3076-83.

21 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
8 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

250. Sharon N, Lis H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 1989; 246 (4927):227-34.
251. Sharon N, Lis H. Legume lectins; a large family of homologous proteins. *FASEB J*. 1990; 4:3198-208.
252. Sharon N, Lis H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001; 491:1-16.
253. Sharon N, Lis H. How proteins bind carbohydrates: Lessons from Legume Lectins. *J. Agric. Food. Chem.* 2002; 50:6586-91.
254. Sharon N, Lis H. *Lectins*. 2a Ed. Kluwer Academic Publishers. 2003. Netherlands.
255. Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004; 14 (11):53R-62R.
256. Sharon N, Lis H. *Lectins*. Springer Science, Netherlands. 2007.
257. Sharpe CE. Applied molecular evolution of peanut agglutinin: Increasing binding specificity towards tumour cell markers. Tesis Doctoral; University of Cambridge, 2003.
258. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*. 1996; 68:850-8.
259. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen J.V, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 2006; 1 (6):2856-60.
260. Sierra AJ, Pérez G. Extracción, purificación y caracterización de dos lectinas en semillas de *Dioclea serícea*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 1999; Vol XXIII, 88:446-54.

261. Sigma-Aldrich. TRI Reagent® Protocol. {En línea}. {23 de marzo de 2014} disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>.
262. Singh T, Chatterjee U, Wu JH, Chatterjee BP, Wu AM. Carbohydrate recognition factors of a T α (Gal β 1-3GalNAc α 1 Ser/Thr) and Tn (GalNAc α 1 Ser/Thr) specific lectin isolated from the seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Glycobiology*. 2005; 15:67-78.
263. Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rougé P, Van Damme EJM, Wu AM. Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol. Immunol*. 2007; 44:451-62.
264. Smith P, Rohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem*. 1985; 150 (1):76-85.
265. Souza Teixeira C, da Silva HC, de Moura TR, Pereira-Junior FN, do Nascimento KS, Nagano CS, Sampaio AH, Delatorre P, Rocha BA, Cavada BS. Crystal structure of the lectin of *Camptosema pedicellatum*: implications of a conservative substitution at the hydrophobic subsite. *J. Biochem*. 2012; 152 (1):87-98.
266. Spackman DH, Stein WH, Moore S. The disulfide bonds of ribonuclease. *J. Biol. Chem*. 1960; 235:648–59.
267. Spies JR, Chambers DC. Chemical determination of tryptophan: Study of color-forming reactions of tryptophan, p-dimethylaminobenzaldehyde, and sodium nitrite in sulfuric acid solution. *Anal. Chem*. 1948; 20 (1):30-9.
268. Springer GF. T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*. 1984; 224 (4654):1198-206.
269. Springer GF. Immunoreactive T and Tn epitopes en cancer diagnosis, prognosis and immunotherapy. *J. Mol. Med. (Berl)*. 1997; 75 (8):594-602.
270. Stillmark H. Uber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen uphorbiaceen. Tesis Doctoral: Dorpat University, Estonia; 1888.

22 0 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

271. Strahler J, Kiuck R, Hanash S. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In Protein structure. Creighton TE, editor. IRL Press, Oxford. 1995; 65-92.
272. Sumner JB, Gralen N, Eriksson-Quensel I. The Molecular Weights of Urease, Canavalin, Concanavalin a and Concanavalin B. Science. 1938. 87(2261): 395-6.
273. Susuki N, Yamamoto K, Toyoshima S, Osawa T, Irimura T. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human macrophage C-type lectin: Its unique carbohydrate binding specificity for Tn lectin. J.Immunol. 1996; 156:128-35.
274. Syed P, Gidwani K, Kekki H, Leivo J, Pettersson K, Lamminmaki U. Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. Proteomics. 2016; 16(8):1257-65.
275. Tanaka H, Toyama J, Akashi R. Molecular characterization of a galactose-binding lectin from *Momordica charantia* seeds and its expression in Tobacco cells. Asian J. Plant Sci. 2009; 8 (8):544-50.
276. Tateno H, Winter HC, Petryniak J, Goldstein IJ. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of novel members of Jacalin-related Lectins from rhizomes of the true fern *Plebodium aureum* (L) J. Smith (Polypodiaceae). J. Biol. Chem. 2003; 278 (13):10891-9.
277. Tateno H, Mori A, Uchiyama N, Yabe R, Iwaki J, Shikanai T, Angata T, Narimatsu H, Hirabayashi J. Glycoconjugate microarray based on an evanescent-field fluorescence-assisted detection principle for investigation of glycan-binding proteins. Glycobiology, 2008; 18 (10):789-98.
278. Tateno H, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J. Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography. Glicobiology. 2009; 19 (5):527-36.
279. Tavares GA, Caracelli I, Burger R, Correia MTS, Coelho LCBB, Oliva G. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 1996; 52:1046-7.

280. Terra VS, Homer KA, Rao SG, Andrew PW, Yesilkaya H. Characterization of Novel β -Galactosidase Activity That Contributes to Glycoprotein Degradation and Virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2010; 78 (1):348–57.
281. The Plant List. Version 1.1. 2013. Publicada en Internet; <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae/> (consultada el 31 de octubre de 2016).
282. Thermo Scientific. Glycoprotein Expression Kits. Thermo Scientific Pierce Human In Vitro Translation Technical Handbook. 2009; 14.
283. Thermo Scientific. Histidine-Tagged Proteins. Thermo Scientific Pierce Human In Vitro Translation Technical Handbook. 2009; 28.
284. Thermo Scientific. RevertAid™ first strand cDNA Synthesis Kit. {En línea}. {26 de marzo de 2016} disponible en: https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0012716_RevertAid_FirstStrand_cDNA_Syn_K1622_UG.pdf
285. Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses—Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu. Rev. Immunol.* 2016; 34:243-64.
286. Tollefsen SE, Kornfeld R. Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa*. Two distinct carbohydrate binding activities are present in seed extracts. *J. Biol. Chem.* 1983; 258 (8):5165-71.
287. Torres JC. Purificación y caracterización parcial de mucina citoplasmática utilizando la lectina de *Salvia bogotensis*. Trabajo de grado de Maestría, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 2010.
288. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:4350-4.

22 Aproximación a la estructura primaria de lectinas específicas para el antígeno Tn
2 e identificación de nuevas lectinas específicas para glucosa/manosa en semillas
de *Salvia bogotensis* y *Lepechinia bullata*

289. Transue TR, Smith AK, Mo H, Goldstein IJ, Saper MA. Structure of benzyl-T-antigen disaccharide bound to *Amaranthus caudatus* agglutinin. *Nat. Struct. Biol.* 1997; 4:779-83.
290. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010; 31:455-61.
291. Van Damme EJM, Allen AK, Peumans WJ. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Lett.* 1987; 215:140–14.
292. Van Damme EJM, Peumans WJ, Pusztai A, Bardocz S. *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley, Chichester, UK, 1998.
293. Van Damme EJM, Hause B, Hu J, Barre A, Rougé P, Proost P, Peumans WJ. Two Distinct Jacalin-Related Lectins with a Different Specificity and Subcellular Location Are Major Vegetative Storage Proteins in the Bark of the Black Mulberry Tree. *Plant Physiol.* 2002; 130:757-69.
294. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. *Plant Lectins. Advances in botanical research*. Vol. 48. Kader JC, Delseny M, editors. Belgium; 2008. 107-209.
295. Van Damme EJM. Lectins as tools to select for glycosylated proteins. Gel-free proteomics. *Methods Mol. Biol.* 2011; 753:289-97.
296. Vandeborre G, Smagghe G, Van Damme EJM. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry.* 2011; 72:1538–50.
297. Van Driessche E, Beeckmans S, Dejaegere R, Kanarek L. Thiourea: The antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich plant tissues. *Anal. Biochem.* 1983; 141:184–88.

298. Van Driessche E, De Cupere F, Cruz E, Machado J, Beeckmans S. Lectinas de origen vegetal: Definiciones, purificación y aplicaciones. *Acta Farm. Bonaerense*. 2000; 19 (2):147-54.
299. Vasta G, Ahmed H, editors. *Animal Lectins. A functional view*. Boca Ratón: CRC Press; 2009.
300. Vamvaka E, Arcalis E, Ramessar K, Abbey E, Barry R. O'Keefe BR; Shattock J, Medina V, Stoger E, Christou P, Capell T. Rice endosperm is cost-effective for the production of recombinant griffithsin with potent activity against HIV. *Plant Biotech. J*. 2016; 14:1427-37.
301. Van Halbeek H. Dorland L, Vliegthart JFG, Kochetkov K, Arbatsky NP, Derevitskaya VA. Characterization of the primary structure and the microheterogeneity of the carbohydrate chains of porcine blood – group H substance by 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem*. 1982; 127:21-9.
302. Varejão N, Almeida MS, De Cicco NNT., Atella GC; Coelho LCBB, Correia MTS et al. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochim. Biophys. Acta*. 2010; 1804:191724.
303. Vega NA. Detección, purificación y caracterización parcial de la lectina presente en las semillas del género *Salvia*. Trabajo de grado, Departamento de Química: Universidad Nacional de Colombia; 1997.
304. Vega NA. Caracterización bioquímica, funcional y biológica de la lectina de *Salvia bogotensis* y evaluación de su aplicación para la detección del antígeno Tn. Tesis Doctoral en Química: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
305. Vega NA, Pérez G. Isolation and characterization of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry*. 2006; 67 (4):347-55.
306. Vega NA, Murcia HW, Pérez G. Characterization of *Salvia bogotensis* anti-lectin IgYs and their application in immunochemical studies involving Tn antigen detection. *Rev. Colomb. Quím*. 2009; 38 (3):363-77.

307. Wall DB, Kachman MT, Gong SS, Parus SJ, Long MW, Lubman DM. Isoelectric focusing nonporous silica reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry: a three-dimensional liquid-phase protein separation method as applied to the human erythroleukemia cell-line. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2001; 15 (18):1649-61.
308. Wang W, Peumans WJ, Rougé P, Rossi C, Proost P, Chen J, Van Damme EJM. Leaves of the Lamiaceae species *Glechoma hederacea* (ground ivy) contain a lectin that is structurally and evolutionary related to the legume lectins. *Plant J.* 2003a; 33 (2):293-304.
309. Wang W, Hause B, Peumans WJ, Smaghe G, Mackie A, Fraser R, Van Damme EJM. The Tn antigen-specific lectin from ground ivy is an insecticidal protein with an unusual physiology. *Plant Physiol.* 2003b; 132 (3):1322-34.
310. Wang WQ, Zhang ZH, Zhou JP, Pang H, Lü HX. An overview of glycoconjugates for cancer targeting therapy and diagnosis. *Acta Pharm Sin B.* 2013. 48(12):1763-70.
311. Watanabe K, Hakomori SI. Characterization of a blood group I-active ganglioside. Structural requirements for I and I specificities. *J. Biol. Chem.* 1979; 254 (9):3221-8.
312. Weiss WI, Kahn R, Fourme R, Drickramer K, Hendrickson W. Structure of the calcium dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science.* 1991; 254 (5038):1608-15.
313. Wenping H, Limin H, Zhezhi W. Molecular cloning and expression of a novel gene related to legume lectin from *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Afr. J. Biotechnol.* 2015; 14 (28):2234-43.

314. Wilches A, Pérez G, Rojas JV, Sanabria E, Quintero S, Vega NA. Purification and characterization of a lectin from *Lepechinia bullata* seeds. 26th International Carbohydrate Symposium. 2012. Madrid (España).
315. Wilches A, Fernández-Alonso JL, Reyes EA, Imberty A, Varrot A, Vega NA. Purification of a new lectin present in seeds from *Lepechinia bullata* and *Salvia bogotensis* genu. 28th International Carbohydrates Symposium. 2016. New Orleans (USA).
316. Wood JRI, Harley RM. The genus *Salvia* (*Labiatae*) in Colombia. Kew Bulletin. 1989; 44 (2):211-79.
317. Wu AM, Lin SR, Chin LK, Chow LP, Lin JY. Defining the carbohydrate specificities of *Abrus precatorius* agglutinin as T (Gal β 1-3GalNAc) > I/II (Gal β 1-3/4GlcNAc). J. Biol. Chem. 1992; 267: 19130-9.
318. Wu AM, Duk M, Lin M, Broadberry RE, Lisowska E. Identification of variant glycoporphins of human red cells by lectinoblotting: Application to the Mi. III variant that is relatively frequent in the Taiwanese population. Transfusion. 1995; 35 (7):571-6.
319. Wu AM, Wu JH, Song SC, Kabat EA. Bandeiraea (*Griffonia*) *simplicifolia* lectin-I, isolectin A4, reacting with Tn (GalNAc α -1 Ser/Thr) or galabiose (Gal α -1 4Gal) containing ligands. FEBS Lett. 1996; 398:183-6.
320. Wu AM, Song SC, Sugii SH, Herp A. Differential binding properties of Gal/GalNAc specific lectins available for characterization of glycoreceptors. Indian J. Biochem. Biophys. 1997; 34 (1-2):61-71.
321. Wu AM, Wu JH, Herp A, Liu JH. Effect of polyvalencies of glycotopes on the binding of a lectin from the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Biochem. J. 2003; 371 (Pt 2):311-20.
322. Wu AM. Polyvalency of Tn (GalNAc α 1 Ser/Thr) glycotope as a critical factor for *Vicia villosa* B₄ and glycoprotein interactions. FEBS Lett. 2004; 562: 51- 58.

323. Wu AM. Lectinochemical studies on the glyco-recognition factors of a Tn (GalNAc α 1-Ser/Thr) specific lectin isolated from the seeds of *Salvia sclarea*. J. Biomed. Sci. 2005; 12(1):167-84.
324. Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. Glycoconj. J. 2009; 26:899-913.
325. Wu J, Zhu J, Yin H, Buckanovich RJ, Lubman DM. Analysis of glycan variation on glycoproteins from serum by the reverse lectin-based ELISA assay. J. Proteome Res. 2014; 13(4):2197-204.
326. Wright CS. New folds of plant lectins. Curr. Opin. Struct. Biol. 1997; 7:631-36.
327. Yamamoto K, Ito S, Yasukawa F, Konami Y, Matsumoto N. Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. Anal. Biochem. 2004; 336 (1):28-38.
328. Yamamoto S, Kinoshita M, Suzuki S. Current landscape of protein glycosylation analysis and recent progress toward a novel paradigm of glycoscience research. J. Pharm. Biomed. Anal. 2016; In press.
329. Yang J, Roy A, Zhang Y. BioLiP: a semi-manually curated database for biologically relevant ligand protein interactions. Nucleic Acids Res. 2013; 41:D1096-1103.
330. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions, Nucleic Acids Res. 2015a; 43: W174-81.
331. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nat. Methods. 2015b; 12:7-8.
332. Yang RY, Rabinovich GA and Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. Expert Rev. Mol. Med. 2008; 10:e17.

333. Zenteno E, Lescurain R, Montano LF, Vazquez L, Debray H, Montreuil J. Specificity of *Amaranthus leucocarpus* lectin. *Glycoconjugate J.* 1992; 9:204-8.
334. Zenteno R, Chavez R, Portugal D, Paez A, Lascurain R, Zenteno E. Purification of a N-acetyl-d-galactosamine specific lectin from the orchid *Laelia autumnalis*. *Phytochemistry.* 1995; 40:651-5.
335. Zenteno E, Vásquez R, Córdoba F, Wieruszkeski JM, Montreuil J, Debray H. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. *Glycoconj. J.* 1995; 12:699-706.
336. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9:40.
337. Zymo Research. Direct-zol™ RNA miniprep. {En línea}. {23 de marzo de 2014} disponible en: <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/467/r2050i.pdf>
338. Zymo research. Zymoclean™ Gel DNA Recovery kit. {En línea}. {26 de marzo de 2016} disponible en: (<http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/184/d4001d.pdf>)