



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de las lectinas presentes en el alga roja *Tricleocarpa cylindrica*

Angie Patricia Duarte Tayo

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

2021

Estudio de las lectinas presentes en el alga roja *Tricleocarpa cylindrica*

Angie Patricia Duarte Tayo

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Ciencias Bioquímica

Directora:

Dr Sc Nohora Angélica Vega Castro

Codirectora:

Ph.D. Mónica Puyana Hegedus

Línea de Investigación:

Estudios de Lectinas de algas marinas del Caribe Colombiano

Grupo de Investigación:

Grupo de investigación en Proteínas (GRIP)

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021

A mis hermanos y a mis padres.

“On the mountains of truth, you can never climb in vain: either you will reach a point higher up today, or you will be training your powers so that you will be able to climb higher tomorrow.”

“Im Gebirge der Wahrheit kletterst du nie umsonst: entweder du kommst schon heute weiter hinauf oder du übst deine Kräfte, um morgen höher steigen zu können.”

Friedrich Nietzsche

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Angie Patricia Duarte Tayo', written over a horizontal line.

Angie Patricia Duarte Tayo

Bogotá, 25 de noviembre de 2021

Agradecimientos

A mi familia, al universo y la vida misma.

Un profundo agradecimiento a mi directora de tesis la profesora Nohora Angélica Vega Castro por su apoyo incondicional y conocimientos, los cuáles fueron fundamentales para la realización y culminación de este proyecto de grado. A mi codirectora, la profesora Mónica Puyana Hegedus, por su ayuda en la recolección de muestras, su respaldo hacia el proyecto y sus consejos. A mis compañeros del grupo de investigación en proteínas, por su cooperación en la ejecución del proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme la beca de Asistente Docente que no solo me permitió financiar parte de mis estudios, sino que me brindo una experiencia profesional y personal enriquecedora.

Resumen

Estudio de las lectinas presentes en el alga roja *Tricleocarpa cylindrica*

El estudio en lectinas de algas es menor comparado con vegetales o animales, sin embargo, se han estudiado principalmente en algas rojas (Phylum Rhodophyta). Por otra parte, la purificación de estas moléculas es dispendiosa por los pigmentos que contienen sus extractos proteicos. En este estudio se llevaron a cabo ensayos de purificación de las lectinas del alga roja *Tricleocarpa cylindrica*, pues previamente se detectó su actividad aglutinante; por otra parte, se ha reportado que estas lectinas tienen diferentes actividades biológicas que las postulan como moléculas de gran interés farmacológico.

Inicialmente se realizó un tratamiento con acetona a la harina del alga para eliminar interferentes que producen hemólisis de eritrocitos, por precipitación con sulfato de amonio se detectó únicamente actividad aglutinante en la fracción del 50-80%, los ensayos de inhibición con carbohidratos mostraron reconocimiento principalmente por D-glucosa. Aglutinó preferentemente eritrocitos de humano tipo B con cantidades de 0.6 μg de proteína pura, similar a lo reportado para lectinas de otras especies de algas rojas.

La lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC) se purificó con una combinación de métodos cromatográficos, que incluyeron intercambio iónico, afinidad y un paso final con HPLC. Esta nueva proteína se caracterizó por ser una glicoproteína con un peso molecular de 29 kDa por SDS PAGE, un punto isoeléctrico ácido (5.7) y alta estabilidad en un rango de pH de 3.0-7.4 y temperatura hasta los 58°C.

Palabras clave: lectinas, algas marinas, *Tricleocarpa cylindrica*, aglutinación, caracterización bioquímica, carbohidratos, interacciones proteína.

Abstract

Study of the lectins from the red algae *Tricleocarpa cylindrica*

Lectins from marine algae have not been studied such as vegetables or animals, even though, their study is centered in red algae (Phylum Rhodophyta). Furthermore, purification of these proteins is difficult due to pigments in saline extracts. In this study, purification of the lectins from the red algae *Tricleocarpa cylindrica* were carried out because hemagglutination activity was detected previously; additionally, these lectins could be molecules of great pharmacological potential for its various biological activities.

First, removal of pigments was achieved by washing the algae flour with cool acetone to avoid hemolysis, precipitation assays from PBS extracts showed that the whole lectin was obtained in the fractions precipitated with ammonium sulphate 50-80%. The lectin was able to agglutinate human RBCs from B and O donors; although it agglutinated preferentially B erythrocytes with a minimum lectin quantity of 0.6 µg, like other species studied.

Several purification procedures were assayed which included DEAE-sephadex, affinity chromatography, and the last step on HPLC. It led to obtaining a pure lectin having high specific agglutination activity (SAA). The PI showed a unique band at pH 5.7, in SDS-PAGE a band around 29 kDa, thermal stability (58 0C), and activity in the pH range 3.0-7.4.

Keywords: lectins, seaweed, *Tricleocarpa cylindrica*, agglutination, biochemical characterization, carbohydrates, protein interactions.

Contenido

Pág.

| | |
|--|-----------|
| Resumen | VII |
| Lista de figuras | XI |
| Lista de tablas | XIV |
| Lista de Diagramas | XVI |
| Lista de Símbolos y abreviaturas | XVII |
| Introducción | 1 |
| 1. Marco Teórico | 4 |
| 1.1 Lectinas | 4 |
| 1.1.1 Historia..... | 4 |
| 1.1.2 Clasificación..... | 6 |
| 1.1.3 Papel biológico | 9 |
| 1.2 Lectinas en algas marinas | 16 |
| 1.3 <i>Tricleocarpa cylindrica</i> | 22 |
| 2. Elaboración de extractos, evaluación de actividad aglutinante y ensayos previos de purificación de la lectina de <i>T. cylindrica</i>..... | 24 |
| 2.1 Metodología..... | 24 |
| 2.1.1 Obtención de extractos salinos | 24 |
| 2.1.2 Título y actividad aglutinante..... | 26 |
| 2.1.3 Cuantificación de proteínas..... | 26 |
| 2.1.4 Electroforesis | 27 |
| 2.1.5 Aislamiento por precipitación con sulfato de amonio | 27 |
| 2.1.6 Cromatografía de intercambio iónico | 28 |
| 2.2 Resultados y Análisis | 28 |
| 2.2.1 Obtención de extractos desprovistos de pigmentos | 28 |
| 2.2.2 Actividad aglutinante sobre eritrocitos ABO de humano | 32 |
| 2.2.3 Cuantificación de proteínas..... | 34 |
| 2.2.4 Precipitación con sulfato de amonio | 39 |
| 2.2.5 Cromatografía de Intercambio Iónico..... | 43 |
| 3. Ensayos de Inhibición de Carbohidratos | 49 |
| 3.1 Metodología..... | 49 |
| 3.2 Resultados y Análisis | 49 |

| | |
|---|------------|
| 4. Purificación de la lectina de <i>T. cylindrica</i> (LTC) | 57 |
| 4.1 Cromatografía de afinidad | 57 |
| 4.1.1 Metodología | 57 |
| 4.1.2 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glucosa..... | 58 |
| 4.1.3 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa | 59 |
| 4.1.4 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA | 61 |
| 4.1.5 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa | 65 |
| 4.2 HPLC | 71 |
| 4.2.1 Metodología | 71 |
| 4.2.2 Resultados y Análisis | 72 |
| 5. Caracterización parcial de la lectina de <i>Tricleocarpa cylindrica</i> (LTC) | 77 |
| 5.1 Metodología..... | 77 |
| 5.1.1 Determinación del punto isoeléctrico | 77 |
| 5.1.2 Ensayos de glicosilación | 77 |
| 5.1.3 Efecto del pH y la temperatura..... | 77 |
| 5.2 Resultados y Análisis..... | 78 |
| 6. Conclusiones y recomendaciones | 85 |
| 6.1 Conclusiones..... | 85 |
| 6.2 Recomendaciones | 87 |
| ANEXOS | 88 |
| Bibliografía | 107 |

Lista de figuras

Pág.

Marco teórico

| | |
|--|----|
| Figura 1- 1: Clasificación de las lectinas con respecto a su estructura molecular..... | 7 |
| Figura 1- 2: Mecanismo de acción de la vía de las lectinas en peces | 15 |
| Figura 1- 3: Plegamiento Barril- β en el modelo molecular de las lectinas KAA-2 de <i>Kappaphycus alvarezii</i> y GFRT de <i>Griffithsia sp.</i> | 17 |
| Figura 1- 4: <i>Tricleocarpa cylindrica</i> | 23 |

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Figura 2- 1: Escala de actividad cualitativa para los ensayos de eritroaglutinación (40x). | 26 |
| Figura 2- 2: Harina de alga proveniente de <i>T. cylindrica</i> y eliminación de pigmentos..... | 29 |
| Figura 2- 3: Coloración de los extractos obtenidos de la harina de alga de <i>T. cylindrica</i> . | 30 |
| Figura 2- 4: Estructura de las ficobilinas y conformación del ficobilisoma en las ficobiliproteínas de algas marinas. | 31 |
| Figura 2- 5: Ensayos de eritroaglutinación usando suspensiones de eritrocitos al 2% de los grupos sanguíneos ABO (observación a 40x) (ETc2-UD). | 33 |
| Figura 2- 6: SDS-PAGE + Δ -DTT para pool de extractos tratados (ETc1) y no tratados con acetona (ETc-Nt)..... | 39 |
| Figura 2- 7: Ensayos de eritroaglutinación con eritrocitos B al 2% para fracciones de la precipitación con sulfato de amonio de ETc1. | 39 |
| Figura 2- 8: Ensayos de eritroaglutinación con eritrocitos B al 2% para la fracción 50-80% _s obtenida del extracto ETc2-UD (10X) (54 μ g). | 41 |
| Figura 2- 9: Extractos obtenidos con sulfato de amonio como agente precipitante. | 43 |
| Figura 2- 10: Cromatografía de intercambio iónico -DEAE Sephadex A-50 ETc2-UD. | 44 |
| Figura 2- 11: Ensayos de aglutinación con eritrocitos B al 2% -Cromatografía de intercambio iónico muestra ETc2-UD..... | 44 |
| Figura 2- 12: Cromatografía de intercambio iónico -DEAE Sephadex A-50 para la F50-80% _s ETc3-DL..... | 45 |
| Figura 2- 13: Perfil cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sepharosa secuencial. . | 46 |
| Figura 2- 14: Cromatografía de Intercambio aniónico Hitrap Q HP para fracción activa F1 FNR proveniente de cromatografía de intercambio iónico DEAE Sephadex A-50..... | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 2- 15: SDS PAGE- tricina +10% fracciones de FPLC. | 48 |
|--|----|

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Figura 3- 1: Estructuras de los monosacáridos y el disacárido usados en los ensayos de inhibición preliminares. | 50 |
| Figura 3- 2: Tipos de determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos A y B, tipos I-VI. | 52 |
| Figura 3- 3: Docking Galectina-4 de humano con los tipos I, II y VI, del determinante antigénico B | 54 |
| Figura 3- 4: Trehalosa en el sitio de reconocimiento de carbohidratos (CDR) de la lectina ConM de <i>Canavalia maritima</i> | 56 |

Capítulo 4

| | |
|---|----|
| Figura 4- 1: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Glucosa F 50-80% de ETc2-UD. | 58 |
| Figura 4- 2: SDS PAGE 12% Tris-glicina + Δ -DTT Fracciones de cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glucosa..... | 59 |
| Figura 4- 3: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Trehalosa..... | 60 |
| Figura 4- 4: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA..... | 61 |
| Figura 4- 5: SDS PAGE-tricina 10% Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA.... | 62 |
| Figura 4- 6: Recromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-ConA..... | 63 |
| Figura 4- 7: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA muestra F1 FNR FPLC. ... | 64 |
| Figura 4- 8: Oligosacárido alto en manosa presente en la invertasa aislada de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 65 |
| Figura 4- 9: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa muestra F1 FNR DEAE-Sepharosa. | 66 |
| Figura 4- 10: Árbol filogenético de los géneros cuyas lectinas aisladas presentan pesos moleculares cercanos a los de la aislada de <i>T. cylindrica</i> | 70 |
| Figura 4- 11: Perfil HPLC muestra F2 FR proveniente de Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B Trehalosa..... | 72 |
| Figura 4- 12: Electroforesis de las fracciones obtenidas F6-F14 por HPLC. | 73 |
| Figura 4- 13: Perfil HPLC fracciones C1-C3 muestra F2 FR de Sepharosa 4B-Trehalosa. | 75 |

Capítulo 5

| | |
|--|----|
| Figura 5- 1: Punto isoeléctrico lectina de <i>Tricleocarpa cylindrica</i> (LTC). | 78 |
| Figura 5- 2: Detección de la glicosilación en glicoproteínas y la LTC. | 82 |
| Figura 5- 3: Efecto del pH y la temperatura en la actividad. | 83 |

Anexos

- Figura C- 1:** Alineamiento de secuencias de algas rojas curadas en Uniprot con el N-terminal de la Galectina-4 de humano usando Clustal W (Matriz BLOSUM62)..... 95
- Figura C- 2:** Alineamiento de secuencias de algas rojas curadas en Uniprot con el N-terminal de la Galectina-4 de humano usando COBALT (Matriz BLOSUM80)..... 96
- Figura C- 3:** Detalle del residuo conservado Prolina en posición 83 en el alineamiento de secuencias de algas rojas curadas en Uniprot con el N-terminal de la Galectina-4 de humano usando COBALT (Matriz BLOSUM80). 96
- Figura E- 1:** Evaluación de soportes para cromatografía de Afinidad- Sepharosa 4-B. 100
- Figura F- 1:** Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa muestra F1 FNR FPLC. 101
- Figura G- 1:** Lectomas parciales del coral blando *Dendronephthya gigantea* y el hongo *Laccaria bicolor*. 102
- Figura H- 1:** Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa muestra F1 FNR DEAE-Sepharosa. 103
- Figura J- 1:** DOT-BLOT para identificación de interacción de lectinas biotiniladas. 105

Lista de tablas

Pág.

Marco teórico

| | |
|--|----|
| Tabla 1- 1: Familias de lectinas en vertebrados, localización y funciones. | 10 |
| Tabla 1- 2: Tipos de lectinas en bacterias | 12 |
| Tabla 1- 3: Lectinas de algas marinas registradas y curadas en Uniprot..... | 20 |
| Tabla 1- 4: Lectinas de algas marinas y actividad biológica. | 21 |

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Tabla 2- 1: Extractos de la harina de <i>Tricleocarpa cylindrica</i> | 29 |
| Tabla 2- 2: Extractos de <i>Tricleocarpa cylindrica</i> con y sin tratamiento con acetona..... | 30 |
| Tabla 2- 3: actividad aglutinante sobre eritrocitos ABO extractos de <i>T. cylindrica</i> | 33 |
| Tabla 2- 4: Cuantificación de proteínas en extractos del alga <i>T. cylindrica</i> usando el método de micro-Kjeldahl..... | 35 |
| Tabla 2- 5: Contenido de proteína extractos proteicos de algas marinas..... | 38 |
| Tabla 2- 6: Extractos utilizados para el aislamiento con sulfato de amonio y fracciones resultantes..... | 40 |
| Tabla 2- 7: Fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico -DEAE Sephadex A-50 sobre extracto ETc2-UD y F 50-80% _s ETc3-DL..... | 45 |
| Tabla 2- 8: Fracciones FPLC muestra F1 FNR DEAE-Sepharosa. | 47 |

Capítulo 3

| | |
|--|----|
| Tabla 3- 1: Inhibición de Disacáridos y Trisacáridos..... | 54 |
| Tabla 3- 2: Estructuras de los disacáridos y el trisacárido ensayados | 55 |

Capítulo 4

| | |
|--|----|
| Tabla 4- 1: Fracciones obtenidas cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glucosa | 59 |
| Tabla 4- 2: Fracciones obtenidas cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa. . | 60 |
| Tabla 4- 3: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA..... | 61 |

| | |
|--|----|
| Tabla 4- 4: Ensayos de Inhibición fracción no retenida (F1 FNR) recromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B ConA | 63 |
| Tabla 4- 5: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-ConA | 64 |
| Tabla 4- 6: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Invertasa. | 66 |
| Tabla 4- 7: Resumen de las etapas de purificación de la LTC. | 67 |
| Tabla 4- 8: Lectomas en diferentes organismos marinos. | 67 |
| Tabla 4- 9: Porcentaje de recuperación para algunas lectinas aisladas de algas. | 68 |
| Tabla 4- 10: Lectinas de algas rojas pesos moleculares | 69 |
| Tabla 4- 11: Purificación por HPLC de la muestra F2 FR Sepharosa 4B-Trehalosa. | 73 |
| Tabla 4- 12: Fracciones HPLC muestra F2 FR ConA. | 75 |

Capítulo 5

| | |
|---|----|
| Tabla 5- 1: Características moleculares y porcentaje de residuos de aminoácidos ácidos para lectinas aisladas de algas. | 79 |
| Tabla 5- 2: Características moleculares de lectinas aisladas de algas. | 79 |

Conclusiones y recomendaciones

| | |
|--|----|
| Tabla 6- 1: Lectinas de algas marinas, características bioquímicas y de aislamiento. | 86 |
|--|----|

Anexos

| | |
|---|-----|
| Tabla B- 1: Datos para la muestra de cálculo determinación %Proteína total Kjeldahl en la harina utilizada en ETc1. | 93 |
| Tabla I- 1: Composición geles poliacrilamida para la determinación del punto isoeléctrico. | 104 |

Lista de Diagramas

Pág.

Capítulo 2

Diagrama 2- 1: Obtención del extracto algal de *Tricleocarpa cylindrica*. 25

Capítulo 4

Diagrama 4- 1: Metodología para el aislamiento de la lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC). 76

Lista de Símbolos y abreviaturas

| Abreviatura/Símbolo | Término |
|----------------------|---|
| BCA | Ácido Bicinconínico |
| BSA | Albúmina Sérica Bovina |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| DTT | Ditiotreitol |
| Δ | Condiciones denaturantes- Calentamiento |
| PBS | Buffer fosfato salino |
| FR | Fracción Retenida |
| FNR | Fracción No Retenida |
| -U | Extracto Concentrado por Ultrafiltración |
| -UD | Extracto Concentrado por Ultrafiltración y Dializado |
| -L | Extracto Concentrado por Liofilización |
| -LD | Extracto Concentrado por Liofilización y Dializado |
| FPLC | Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| DEAE | Dietilaminoetilcelulosa |
| <i>T. cylindrica</i> | <i>Tricleocarpa cylindrica</i> |
| LTC | Lectina de <i>Tricleocarpa cylindrica</i> |
| CRD | Dominio de reconocimiento de carbohidratos |
| Fuc | Fucosa |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | N-Acetilgalactosamina |
| Glc | Glucosa |
| GlcNAc | N-Acetilglucosamina |
| Lac | Lactosa |
| DMF | N,N-dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| CHAPS | 3-((3-colamidopropil) dimetilamonio |
| pI | Punto isoeléctrico |
| DTT | Ditiotreitol |
| CII | Cromatografía de intercambio iónico |
| ConA | Concanavalina A |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| aa | Aminoácidos |
| RIE | Región isoeléctrica |
| GRIP | Grupo de Investigación en Proteínas |
| kDa | Kilo Daltons |
| ANOVA | Análisis de la varianza |
| ConA | Concanavalina A |
| MWCO | Molecular weight cut-off |

Introducción

Las lectinas son proteínas de origen no inmune que reconocen carbohidratos sin inducir ningún cambio químico; por lo tanto tienen dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRDs) específicos (Mu et al., 2017; Taylor et al., 2017; Ajit Varki & Kornfeld, 2017). Se clasifican principalmente por su dominio y/o especificidad de reconocimiento (Motohashi et al., 2017). Son ubicuas en la naturaleza, y se han aislado de plantas, invertebrados y vertebrados, entre otros. Tienen un papel importante en la respuesta inmune de tipo innata mediante el reconocimiento de carbohidratos específicos (Liao et al., 2016), donde su actividad está dada por los sitios de unión a carbohidratos, los glicotopes y su disposición, lo que genera una gran variedad de interacciones lectina-ligando (Gondim et al., 2019).

En algas marinas, el primer reporte de actividad aglutinante fue descrito por Boyd et al. en 1966, quienes evaluaron 24 especies de algas de todos los Phyla. A partir de este trabajo aumento el interés en lectinas de algas, sin embargo, comparado con la gran diversidad del taxa, el número de proteínas estudiadas a la fecha es bajo. Para el año 2012 el número algas estudiadas era de 800 especies, de las cuales alrededor del 60% presentaban actividad aglutinante. Por otra parte, alrededor de 50 lectinas habían sido purificadas y caracterizadas, aun así, este es un número pequeño teniendo en cuenta la diversidad de algas marinas (Teixeira et al., 2012). Con mejores métodos y procesos de extracción este número incrementará en un futuro.

El estudio de lectinas de algas marinas se ha centrado en las especies pertenecientes al Phylum Rodophyta, debido a su potencial biomédico, aunque de las 400.000 especies de algas registradas se han estudiado menos del 5% (Catanzaro et al., 2019; Singh & Walia, 2018), en la actualidad si bien los registros son variados estos no superan las 1400 especies y se han centrado en la identificación de la actividad aglutinante pero son muy pocas las lectinas estudiadas, a pesar de su variada actividad biológica, por ejemplo, en

bases de datos especializadas como UniProt tan solo se reportan siete (7) estructuras de lectinas revisadas, seis (6) de estas pertenecientes al Phylum Rodophyta.

Con respecto a las características moleculares, estas proteínas son de bajo peso molecular, tienen una alta afinidad por oligosacáridos y/o glicoproteínas, aunque se presentan excepciones en algas de los géneros *Codium*, *Enteromorpha*, *Ulva* y *Ptilota* en las que hay inhibición por azúcares simples y son dependientes de cationes (Parseptianga, 2015; Teixeira et al., 2012).

En Colombia se estudiaron siete especies de todos los Phyla de macroalgas encontrando actividad aglutinante con eritrocitos de oveja en cinco de estas; *Bryopsis ramulosa* y *Caulerpa taxifolia*, algas verdes, *Dictyota pinnatifida* y *Sargassum hystrix* var *buxifolium*, algas pardas. El alga roja *Tricleocarpa cylindrica* aglutinó eritrocitos de humano tipo O (Hidalgo, 2017).

La importancia del estudio de las lectinas de algas marinas radica en su actividad biológica; se ha demostrado que una ventaja es su bajo peso molecular y su carácter menos antigénico, comparado con las lectinas de plantas, para ser usadas en modelos biológicos (Teixeira et al., 2012). Las lectinas SfL-1 y SfL-2 (*Solieria filiformis*) inducen la muerte de células tumorales de adenocarcinoma de colon (Colo201) (Barre et al., 2019; Catanzaro et al., 2019; Fukuda et al., 2006; Omokawa et al., 2010), ESA (*Eucheuma serra*), tiene actividad citotóxica en la línea celular HeLa, ATA (*Agardhiella tenera*) sobre línea celular de leucemia en ratón (L5178K) (Barre et al., 2019). Las lectinas del género *Bryothamnion*, tales como *B. seaforthii* (BSL) y *B. triquetrum* (BTL), pueden diferenciar variantes celulares de carcinoma humano de colon, siendo modelos para futuras aplicaciones en el reparto de fármacos (Barre et al., 2019; Catanzaro et al., 2019).

En cuanto a la actividad antiviral, las lectinas KAA-2 (*Kappaphycus alvarezii*), GRFT y GRFN-1 (*Griffithsia* sp.), BCA (*Boodlea coacta*) y OtL (*Ostreococcus tauri*) inhiben el virus del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) por la unión a gp120 en la envoltura proteica (Barre et al., 2019; Catanzaro et al., 2019). Tan solo GRFT ha presentado actividad antiviral frente a otros virus como el HCV (virus de la hepatitis C), HSC-2 (virus del herpes simple tipo 2), SARs-Cov, coronavirus humano (HCoV), entre otros (Mitchell et al., 2017). La actividad antiviral de las lectinas, polisacáridos y otros metabolitos provenientes de algas marinas es reconocida, Pereira & Critchley (2020) reportaron que dicho potencial puede ser aprovechado para combatir el virus SARs-CoV-2, responsable de la pandemia actual.

Lectinas aisladas de algas rojas como *Hypnea cervicornis* (HCA), *Pterocladia capillacea* (PcL) y *Caulerpa cupressoides* (CcL) poseen actividad antiinflamatoria; mientras que *E. serra* (ESA) y *Galaxaura marginata* (GMA), presentan actividad antibacterial frente a patógenos de peces como *Vibrio vulnificus*; y BSL y BTL impiden la adherencia de *Streptococcus* sp. (Teixeira et al., 2012).

Lo anterior nos muestra el potencial que tienen los recursos marinos y sus componentes; actualmente los estudios en lectinas son muy pocos, como la caracterización bioquímica, molecular, estructural y funcional, en un ámbito global e incluso en nuestro país, por lo tanto, el objetivo de este estudio es la purificación y caracterización de la(s) lectina (s) de un alga marina presente en el Caribe colombiano, específicamente la(s) presente(s) en el alga roja *Tricleocarpa cylindrica*

1. Marco Teórico

1.1 Lectinas

1.1.1 Historia

Uno de los primeros organismos en los que se reconoció la presencia de lectinas fueron las plantas, para 1888 Hermann Stillmark evidenció la capacidad de aglutinar eritrocitos que poseían los extractos de semillas de ricino (*Ricinus communis*), razón por lo que en un principio se les conocía como “aglutininas” o “hemaglutininas” (Taylor et al., 2017); así la estructura primaria de su cadena B, con actividad de lectina, fue determinada hasta un siglo después de su descubrimiento por Stillmark (Fujii et al., 2018). Posterior al descubrimiento de la ricina, H. Hellin descubrió una lectina que denominaron Abrina proveniente del regaliz americano *Abrus precatorius*, su importancia mostró su potencial en la creación de modelos de antígenos para dilucidar problemas inmunológicos reemplazando a las toxinas bacterianas que se usaban para la época. Con el uso de lectinas, Paul Ehrlich, considerado el padre de la inmunología moderna, llevó a cabo la primera determinación cuantitativa de un anticuerpo *in vitro* dada su glicosilación (Liener et al., 1986; Sharon & Lis, 2007).

Los estudios realizados por Stillmark mostraban que estas proteínas eran selectivas por eritrocitos de diferentes fuentes animales (Taylor et al., 2017). Landsteiner corroboró la selectividad de estas proteínas usando diferentes lectinas con eritrocitos de siete especies animales y para 1900 hizo el descubrimiento del sistema de grupos sanguíneos ABO (Leiner et al., 1986). En 1919, James B. Sumner descubrió la especificidad de las lectinas a glicanos, y fue el primero en purificarlas a partir de la *Canavalia ensiformis* denominándola Concanavalina A (ConA). Posterior a su purificación, en 1936, J.B.

Sumner y S.F. Howell evidenciaron como la ConA no solo aglutinaba eritrocitos sino que también precipitaba glicógeno en solución, además encontraron que el reconocimiento era inhibido por sacarosa, hecho que comprobó la especificidad a azúcares por estas proteínas (Sharon & Lis, 2007).

Alrededor de 1940 William Boyd y Karl Renkonen identificaron la habilidad de estas proteínas de distinguir entre eritrocitos de diferentes tipos de sangre, lo que llevó a que se propusieran en 1954, por W. Boyd y Elizabeth Shapley, el nombre lectinas que proviene del latín *legere* que significa escoger, así más que evidenciar su naturaleza esta denominación indicó su especificidad (Sharon & Lis, 2004, 2007). Este término fue generalizado por Sharon y Lis en 1972, englobando todas las aglutininas de origen no inmune que tenían especificidad por azúcares independientemente de su procedencia o especificidad por tipos sanguíneos.

Posterior a estos hallazgos se intensificó el estudio de lectinas para identificar su funcionalidad; a principios de 1960 Peter C. Nowell encontró que la lectina proveniente de *Phaseolus vulgaris*, denominada fitohemaglutinina (PHA), tenía la habilidad de estimular a los linfocitos para que llevaran a cabo mitosis, es decir esta lectina poseía un efecto mitogénico, lo que fue importante pues se desconocía que estos tipos celulares pudieran dividirse o diferenciarse; posterior a ello se evidenciaron más lectinas con este efecto que se emplearon en citogenética (Sharon & Lis, 2004).

A principios de 1970 se habían reportado hemaglutininas en numerosos organismos, aunque primordialmente en plantas, inicialmente la purificación se hacía por técnicas convencionales en las que además de extraer lectinas de plantas también se hicieron aproximaciones a la purificación y caracterización de lectinas animales como las provenientes del caracol, *Helix pomatia*, (Hammarston & Kabat, 1969), y del cangrejo herradura *Limulus Polyphemus* (Marchalonis & Edelman, 1968).

Solo hasta 1974 Gilbert Ashwell y Anatol G. Morell aislaron la primera lectina de mamíferos, el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), y para 1974 Vivian Teichberg aisló la que sería la primera lectina específica para β -galactosa a partir de la anguila eléctrica, las cuales se designaron posteriormente como galectinas (Sharon & Lis, 2004). Desde el trabajo de Teichberg muchos grupos de investigación empezaron a aislar lectinas de otros tejidos de vertebrados, la primera de ellas fue la galectina-1 purificada en 1976 en el laboratorio de

Stuart Kornfeld a partir de tejido cardíaco y pulmonar de becerro (Klyosov et al., 2008). A partir de estos estudios, el uso de cromatografía de afinidad y las técnicas recombinantes, el número de lectinas purificadas de animales creció considerablemente (Sharon & Lis, 2004).

Las lectinas, se han aislado de diferentes fuentes como plantas, fluidos de invertebrados, vertebrados ancestrales y células membranales de mamíferos (Singh et al., 2015), estas juegan un papel importante en la respuesta inmune de tipo innata mediante el reconocimiento de carbohidratos específicos (Liao et al., 2016), su actividad está dada por la ubicación de los sitios de unión a carbohidratos, los glicotopes y la disposición de los ligandos, lo que genera una gran variedad de interacciones lectina-carbohidrato, que aún hoy en día falta mucho por descubrir (Gondim et al., 2019).

1.1.2 Clasificación

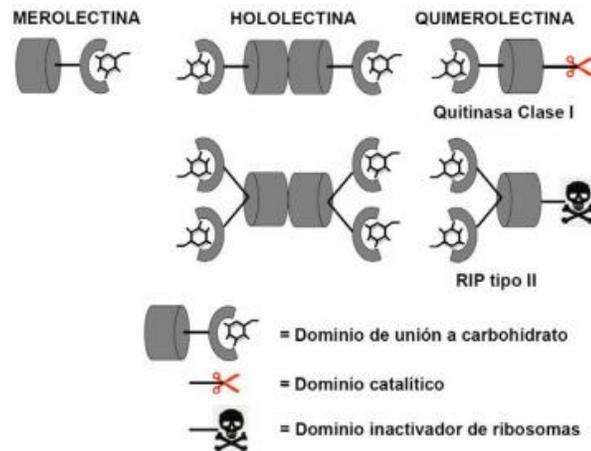
Las lectinas son proteínas de origen no inmune que reconocen motivos de azúcares en una manera no catalítica (Mu et al., 2017), es decir, sin inducir ningún cambio químico en ellas (Liener et al., 1986); poseen dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRDs) que se cree evolucionaron a partir de genes ancestrales comunes, por lo cual su clasificación se da en familias relacionadas evolutivamente que muestran similitud en su estructura primaria, sin embargo los glicanos que son reconocidos por una misma familia de lectinas tienden a ser bastante diversos (Varki et al., 2009; Taylor et al., 2017).

Debido a que poseen diferentes estructuras moleculares, propiedades bioquímicas y biofísicas, presentan variadas funciones biológicas. Están en todos los reinos de la vida y su capacidad de reconocimiento es similar o igual aun cuando estructuralmente se presenta gran variación, por lo tanto, la clasificación de este tipo de proteínas es compleja. De todos los reinos junto con el animal, los más estudiadas son las provenientes de plantas, su clasificación se da bajo criterios variados; en base a la localización subcelular se distinguen dos grupos, las que se sintetizan en los ribosomas y están sujetas al retículo endoplasmático; el segundo consta de las que son sintetizadas sin ningún péptido señal por lo que son trasladadas a los ribosomas libres en el citoplasma (Tsaneva et al., 2019).

Otra clasificación se da con respecto a la estructura molecular, aquellas que poseen un dominio lectina son denominadas “merolectinas”, cuando se presentan dos o más de estos

dominios se designan como “hololectinas” y en una proteína que posee otro dominio proteico diferente se reconocen como “chimerolectinas”, otra denominación es la de “superlectinas” que implica proteínas con múltiples dominios lectina que poseen diferentes propiedades de unión a carbohidratos (**Figura 1- 1**) (Mishra et al., 2019; Tsaneva et al., 2019).

Figura 1- 1: Clasificación de las lectinas con respecto a su estructura molecular.



Fuente: en Nagano (2007) adaptado de Peumans et al. (2001).

Existen clasificaciones basadas en la secuencia de los motivos y conformación de los dominios de reconocimiento a carbohidratos, aunque se reconoce como su especificidad no está ligada a la estructura 3D del CRD. Basados en la abundancia se pueden clasificar en “inducibles” y “clásicas”, las segundas se presentan en mayor abundancia y son las más fácilmente detectables debido a que las primeras, además de expresarse en bajos niveles, están reguladas por la exposición a diferentes factores como estrés abiótico entre otros (Tsaneva et al., 2019).

Debido a que en plantas las especificidades de unión a carbohidratos pueden ser mono o poliespecíficas, las lectinas se clasifican mayoritariamente en 12 familias: homólogos de la aglutinina de *Agaricus bisporus* (AGA), amarantinas, aglutininas relacionadas a quitinasa (CRA), cianovirina, *Euonymus europaeus* lectinas (EUL), familia *Galanthus nivalis* (GNA), proteínas de dominios Heveína, jacalinas, proteínas con dominios de lectinas de leguminosas, portadoras del dominio LysM, lectinas de *Nicotiana tabacum* (familia Nictaba) y familia Ricin-B (Jiang et al., 2010; Tsaneva et al., 2019).

Las lectinas de origen animal, también se clasifican por su secuencia y la selectividad del azúcar al que se unen (Motohashi et al., 2017). Las técnicas de clonación molecular han permitido hacer clasificaciones basadas en la homología de la secuencia de aminoácidos y establecer relaciones evolutivas. La primera clasificación fue propuesta por Kurt Drickamer, quien propuso dos grupos de lectinas, el primero necesita iones calcio para el reconocimiento del carbohidrato y se llamó de tipo C y el segundo donde la lectina tiene en su estructura cisteínas con sus tioles libres, más estables, llamados inicialmente de tipo S; hoy en día se conocen como galectinas dado que los tioles no son un rasgo exclusivo. Otras son las de tipo P, y se caracterizan por reconocer manosa 6 fosfato. Sin embargo las lectinas pueden interactuar con uno o varios glicanos (Varki et al., 2009) como algunas proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas, grupo tipo I, y se caracterizan por reconocer ácido siálico.

Algunas lectinas se encuentran en gran cantidad como las proteínas de reserva en semillas de leguminosas, por lo tanto han sido modelo de investigación (Swamy et al., 1985), y se agrupan dentro de la familia de lectinas tipo L. Las lectinas de Con A y PHA fueron las primeras de este grupo en ser caracterizadas y han sido empleadas en numerosos trabajos de investigación (Taylor et al., 2017).

La mayoría de las agrupaciones de lectinas se hace en base a la homología de secuencia o a la cercanía evolutiva, pero en algunas ancestrales como las pentaxinas su agrupación se da en base a una organización estructural pentamérica y su participación en la respuesta inmune del huésped primario (Varki et al., 2009). Hasta el 2009 no se había una clasificación universal aceptada para lectinas basada en esta homología, por lo que se propusieron dos categorías, la primera con familias de lectinas definidas por su similaridad estructural y/o evolutiva (**Anexo A, Tabla A- 1**) y la segunda, para proteínas tipo lectina en la que la clasificación evolutiva no está establecida (**Anexo A, Tabla A- 2**).

Fujimoto et al., 2014 clasificaron a las lectinas en base a sus motivos estructurales en 48 familias, las familias tipo-L (1), galectinas (2) y pentaxinas (3) tienen en común un plegamiento típico de la concanavalina A tipo β -sándwich, pero que se diferencian en su ensamblaje; para las dos primeras este pueden estar como monómeros o dímeros y para la tercera son pentámeros, además todas están presentes en animales pero las tipo L

pueden encontrarse en plantas y hongos mientras que las galectinas están en virus y hongos. Las tipo-I (4) son las de enrollamiento tipo inmunoglobulina β -sándwich que están unidas a un dominio C-SET y son exclusivas de animales.

Por otra parte, las tipo-C (5) y las Hialaderinas (6) comparten un plegamiento de tipo-C α/β , ambas se unen a dominios diferentes, pero solo las primeras se encuentran como monómeros, dímeros y trímeros, además comparten el ser exclusivas de animales. Las de tipo quitinasa (7) y tipo-M (8) tienen un enrollamiento de barril (β/α) solo son monómeros y están ampliamente distribuidas en animales, plantas, hongos (Fujimoto et al., 2014). En general, estas proteínas comparten la estructura tridimensional, pero los motivos estructurales son diferentes y se generan familias.

La clasificación de las lectinas es amplia, para organismos marinos se reconoce que la mayoría pertenecen a cuatro grupos: tipo C, galectinas, tipo F y de unión a ramosa (RBLs), de estas las primeras son las más comunes, se unen a mono y oligosacáridos dependiendo de los iones Ca^{2+} , adoptan estructuras multidominio que contienen uno o más CRDs de 115-130 aminoácidos, altamente conservados y con funciones biológicas y fisiológicas variadas (Ogawa et al., 2011).

1.1.3 Papel biológico

A partir del descubrimiento de las lectinas el interés en su caracterización ha aumentado por su actividad biológica, en contraste, el estudio de su papel fisiológico en los diferentes organismos ha sido escaso y estaba basado más en hipótesis que en comprobaciones experimentales. Actualmente, se han postulado algunas funciones; por ejemplo, las asocian con el transporte de azúcares o almacenamiento de carbohidratos. En plantas pueden mediar la simbiosis con bacterias captadoras de nitrógeno presentes en los nódulos de los rizoides, por su actividad aglutinante participan en la interacción con patógenos aunque en microorganismos están asociadas a la adhesión a superficies para su colonización (K. Kumar et al., 2012) entre otras. Debido a las diferencias en su especificidad, tienen diferentes funciones, con variabilidad entre especies e incluso en el ciclo de vida de la misma especie, y su localización varía, por ejemplo, para vertebrados hay familias de lectinas que se presentan predominantemente en el espacio intracelular como la familia tipo M, L, P y la de Calnexina, otras están en el espacio extracelular bien sea en

la membrana plasmática o que sean secretadas como las de la familia tipo C, R, galectinas y siglecs, estas presentan funciones diferentes respecto a dicha localización celular. Para las lectinas Interlectinas, de tipo quitinasa, tipo caja-F, ficolinas, entre otras, pueden presentar funciones similares como en la inmunidad de tipo innato, pero otras más específicas son diferenciales, por ejemplo, las de tipo quitinasa están involucradas en el metabolismo del colágeno y las interlectinas están involucradas en embriogénesis si bien las dos comparten su localización de tipo extracelular (**Tabla 1- 1**) (Domínguez, 2008; K. Kumar et al., 2012).

Tabla 1- 1: Familias de lectinas en vertebrados, localización y funciones.

| Familia | Ligandos de sacáridos típicos | Localización subcelular | Ejemplos de funciones |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---|
| Calnexina | Glc, Man | ER | Clasificación de proteínas en el retículo endoplasmático. |
| Lectinas tipo-M | Man | ER | ER-asociado a degradación de glicoproteínas. |
| Lectinas tipo-L | Varios | ER, ERGIC, Golgi | Clasificación de proteínas en el retículo endoplasmático. |
| Lectinas tipo-P | Man 6-fosfato, otros | Vía secretora | Clasificación de proteínas post-Golgi, tráfico de glicoproteínas, ER-asociado a degradación de glicoproteínas, focalización de enzimas. |
| Lectinas tipo-C | Varios | Membrana celular, extracelular | Adhesión celular (selectinas), aclaramiento de glicoproteínas, inmunidad innata (colectinas). |
| Galectinas | β -galactosidos | Citoplasma, extracelular | Crosslinking de glucanos en la matriz extracelular |
| Lectinas tipo-I | Acido siálico | Membrana celular | Adhesión celular |
| Lectinos tipo-R | Varios | Golgi, membrana extracelular | Focalización de enzimas, Recambio de hormonas glicoproteicas. |
| Lectinas caja-F | GlcNAc | Citoplasma | Degradación de glicoproteínas mal plegadas |
| Ficolinas | GlcNAc, GalNAc | Membrana extracelular, extracelular | Inmunidad innata. |
| Lectinas tipo quitinasa | Quito-oligosacáridos | Extracelular | Metabolismo del colágeno (YKL-40). |
| Lectinas tipo-F | Oligosacáridos con Fuc terminal | Extracelular | Inmunidad innata. |
| Interlectinas | Gal, galactofuranosa, pentosas | Extracelular/membrana celular | Inmunidad innata, fertilización y embriogénesis. |

Fuente: K. Kumar et al., 2012.

1.1.3.1 Bacterias

Una de las funciones biológicas de las lectinas en organismos como las bacterias, es el de la iniciación del proceso de infección. Un ejemplo se da con lectinas que reconocen manosa, como FimH, y se encuentran en la superficie de *Escherichia coli*, esta lectina media la unión de la bacteria a la glicoproteína uroplaquina en la superficie de las células epiteliales de la vejiga siendo importante para permitir a la bacteria infectar las vías urinarias del hospedero (Nizet et al., 2017). En un estudio previo esta lectina se inyectó en la vejiga urinaria de ratones, en presencia y ausencia de metil- α -manosido, evidenciándose un decrecimiento en la capacidad infectiva de la bacteria, lo que demostró su participación en el proceso inicial mediando adherencia durante el inicio de la infección (Sharon, 1987).

Debido a esa capacidad de facilitar la unión bacteria-huésped las lectinas de bacterias también se denominan adhesinas (**Tabla 1- 2**), cada bacteria puede presentar múltiples adhesinas con especificidades diferentes, pueden mediar la unión mediante su CRD, a las secuencias externas o internas de cadenas de oligosacáridos lineales o ramificadas (Mishra et al., 2019; Nizet et al., 2017), además, éstas tienen un rol esencial en la determinación del tropismo en el simbiote o el patógeno durante la interacción con los glicanos del huésped (Mishra et al., 2019). Un dominio, LysM, que se encuentra ampliamente distribuido en las lectinas de bacterias, está involucrado en dicha adhesión celular (Bonnardel et al., 2021a), que es importante en la formación de una película formada por glicoproteínas y polisacáridos que permite la interacción con el hospedero.

En bacterias patógenas las lectinas pueden presentarse como subunidades asociadas a unidades catalíticas tóxicas, lectinas asociadas a toxinas (**Tabla 1- 2**), que se dirigen a componentes subcelulares, otras como las solubles pueden expresarse como factores de virulencia en las bacterias oportunistas, y pueden alterar glicolípidos para inducir la internalización de bacterias completas a las células huésped (Bonnardel et al., 2021a; Imberty, 2011).

Tabla 1- 2: Tipos de lectinas en bacterias

| Bacteria | Tipo | Nombre | Especificidad por Carbohidrato | PDB | Oligómero |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------|---|-------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> | Adhesina | PapG | GalNAc β 13Gal α 14Gal β 14Glc | 1J8R | N.E. |
| <i>E. coli</i> | | GatD/F17-G | GlcNAc | 1O9W | N.E. |
| <i>E. coli</i> | | FimH | Oligomanosa | 2CCCO | N.E. |
| <i>Clostridium botulinum</i> | Toxina con dominio lectina | Neurotoxina A y B | Gangliosido GT1b | 2VU9 | Monómero |
| <i>E. coli</i> | | Enterotoxina | Lactosa- Grupo sanguíneo A | 2O2I | Pentámero |
| <i>Vibrio Cholera</i> | | Toxina del cólera | GM1 | 3CHB | Pentámero |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | SEC2 | 3'sialilactosa | 1SE3 | Monómero |
| <i>Bordetella pertussis</i> | | Toxina Pertussis | 6'sialilactosa | 1PTO | Pentámero |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | Lectinas solubles | R2SL | Oligomanosa | 1UQX | Tetrámero |
| <i>Burkholderia cenocepacia</i> | | BC2L-A | Oligomanosa | 2WRA | Dímero |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | PA-IL | Lewis a | 1W8H | Tetrámero |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | | CV-IIL | Epitopes fucosilados de los grupos sanguíneos | 2BOI | Tetrámero |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | | RSL | Epitopes fucosilados de los grupos sanguíneos | 2BS5 | Trímero |

Adaptado de: (Imberty, 2011). N.E.: No especificado.

1.1.3.2 Plantas

Las lectinas aisladas en plantas tienen funciones fisiológicas que se consideran enigmáticas, debido a las diferencias en afinidad reportadas, se presenta variabilidad en su función, inclusive de forma temporal teniendo en cuenta el ciclo de vida de la planta. Rüdiger (2008) divide dichas funciones en dos grupos, extrínsecas, para interacción con el exterior, o de tipo intrínseco, de interacción con moléculas al interior de la planta. Más recientemente se considera como están relacionadas con otras funciones en procesos biológicos relacionados con transducción de señales de estrés y defensa, en las que pueden tener funciones específicas tanto dentro de la célula vegetal como en la interacción directa con otros organismos (De Coninck & Van Damme, 2021; Van Damme, 2021).

Respecto a la función extrínseca consiste en proteger la planta y sus semillas de los depredadores o invasores. Algunos ejemplos de actividad insecticida se observaron con la lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) frente a diferentes especies de insectos, lectinas relacionadas a la familia jacalina y nictaba han mostrado efectos tóxicos sobre insectos, esto se puede explicar debido a su resistencia a las enzimas digestivas presentes en estos, dicha resistencia a la degradación proteolítica es indispensable en la actividad insecticida (Van Damme, 2021). En otros ensayos contra hongos se determinó un efecto fungicida con las lectinas de *Urtica dioica* y Heveína; además se encontró que la lectina del germen de trigo (WGA) está involucrada en la transducción de señales después de la invasión a la planta, por lo tanto, está relacionada en la respuesta generada por procesos de estrés biótico (Rüdiger, 2008). También están presentes en mecanismos de defensa dado que son tóxicas por la interacción con glicoconjugados presentes en la mucosa intestinal o de colón en animales superiores; en el caso de la lectina de Ricina (*Ricinus communis*), se determinó que tiene un CDR y, otro capaz de inhibir la síntesis de proteínas (Pita et al., 2004).

Adicionalmente, lectinas como la del arroz *Oryza sativa* (SALT) regula respuesta a estrés abiótico como la salinidad y estrés por sequía, cuando se sobreexpresa el gen que genera SALT se reconoce como produce plantas con una alta resistencia a la salinidad (De Souza et al., 2003). Otras como las lectinas de la familia Euonymus presentes en el arroz están involucradas en la respuesta al estrés de la planta frente a diferentes patógenos y otros tipos de estrés como a factores abióticos y hormonales (Lambin et al., 2020).

Por otra parte, para entender el proceso de simbiosis se han estudiado las interacciones entre bacterias y plantas, un componente de la pared celular, el ácido murámico (3-O-alpha-Carboxyethyl-D-glucosamina), es reconocido por diversas lectinas, las de mayor afinidad son las pertenecientes a la familia de las Fabáceas, específicas por glucosa y GlcNAc, aunque lectinas específicas por otros carbohidratos, como la de soya (SBA) puede reconocer ácido murámico, con menor afinidad (Rüdiger, 2008).

Con respecto a la función intrínseca, se considera pueden tener un papel en almacenamiento de nutrientes, sin embargo, no es claro, el porqué de su unión a carbohidratos; en comparación con las proteínas de almacenamiento se postuló que estas proteínas podrían participar en procesos de almacenamiento en los cuerpos proteicos durante el desarrollo de la semilla (De Coninck & Van Damme, 2021; Rüdiger, 2008) .

1.1.3.3 Camarones

Los estudios respecto a la función de estas proteínas en camarones es reciente, las lectinas de tipo C en diferentes especies inducen la respuesta inmune posterior a la unión a microorganismos invasores, durante los procesos de fagocitosis, inducción especies reactivas de oxígeno (ROS) e inmunidad antiviral entre otros; similar a las plantas, donde la aglutinación es una forma de defensa básica contra patógenos bacterianos (Alpuche et al., 2005; X. Wang & Wang, 2013)

Las lectinas tipo-C del camarón blanco chino (FcLec1-5) son capaces de aglutinar bacterias Gram (-) y Gram (+) en presencia de calcio, algunas de ellas con mayor eficacia sobre Gram (+) como FcLec 5 (Luo et al., 2006; Zhang et al., 2009); además se ha demostrado aglutinación sobre patógenos naturales como *Vibrio anguillarum* y *Edwardsiella tarda*, principales responsables de enfermedades en el camarón (Xu et al., 2010). Estas proteínas al aglutinar los patógenos de manera directa restringen su diseminación en el plasma pudiendo incluso ser inductoras de otras respuestas de inmunidad (X. Wang & Wang, 2013). Durante el proceso de fagocitosis, participan en el mecanismo de defensa ante invasores pequeños, como bacterias o levaduras, actuando como opsoninas; lo anterior se ha determinado para las lectinas de tipo C de *Penaeus monodon* (PmLec) ante *E. coli*; con patógenos más grandes se promueve una respuesta de encapsulación seguida de melanización (Junkunlo et al., 2012; Luo et al., 2006).

Algunas lectinas pueden funcionar como microbicidas, de forma similar a los péptidos antimicrobianos (AMPs); FcLec1 inhibe el crecimiento de microorganismos, como bacterias Gram (+) y hongos (J. Sun et al., 2008), sumado a lo anterior, también poseen actividad antiviral, esta se ha demostrado con el virus del síndrome de las manchas blancas (WSSV), donde la lectina recombinante FcLec3 interactúa con la proteína VP28, la más abundante de la envoltura del virus. Esta interacción indica una posible función como proteína receptora del virus, que impide la infección viral. Otra lectina de tipo C, *Litopenaeus vannamei* (LvCTL1), se une a los viriones del virus (WSSV) interactuando no solo con VP28 sino con otras proteínas estructurales (VP14-19-24-26-95) (Zhao et al., 2009).

En la carpa cabezona, *Aristichthys nobilis*, una lectina tipo F (GANL) inhibe el crecimiento del patógeno *Vibrio harveyi* por aglutinación (Pan et al., 2010), otras lectinas como la intelectina del pez gato *Silurus asotus* (SalntL) tiene este mismo rol sobre *Aeromonas salmonicida* (Tsutsui et al., 2011). AJL-1 de la anguila japonesa *anguila japónica* inhibe el crecimiento de *Streptococcus difficile* (Tasumi et al., 2004), en todas estas se demuestra la función biológica de las lectinas como mecanismo de defensa en la superficie de la piel de los peces. Otras lectinas como la presente en el huevo del pez cebra *Danio rerio* (zFEL) funciona como factor maternal al interactuar con bacterias Gram (+) y (-) permitiendo la fagocitosis de estas por los macrófagos, así zFEL actúa en la defensa de las larvas o embriones en desarrollo de ataques por patógenos, participando en la inmunidad maternal (Y. Wang et al., 2016).

1.2 Lectinas en algas marinas

El primer reporte de la presencia de lectinas en algas marinas fue hecho por Boyd *et al.*, en 1966, estudiaron 24 especies de algas de todos los Phyla de macroalgas, lo que aumento el interés en su estudio, aunque, comparado con la gran diversidad del taxa, el número de lectinas que han sido aisladas y purificadas a la fecha es muy bajo.

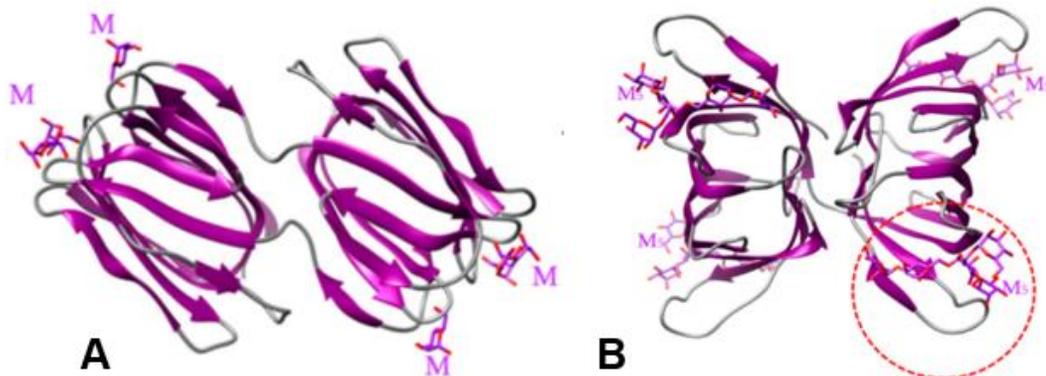
Para el año 2000 de las 326 especies de algas marinas estudiadas, se encontró lectinas en 205 de ellas, que incluyeron 34 de 54 especies de Chlorophyta, 120 de 196 de Rhodophyta y 51 de 76 en Ochrophyta, aunque de este último grupo se requieren más estudios puesto que la presencia de polifenoles puede enmascarar la actividad hemoaglutinante cuando esta es muy débil.

Para el año 2012, se estudiaron 800 especies de algas, de las cuales el 60% presentaban actividad y cerca de 50 lectinas fueron purificadas y caracterizadas, aun así, este es un número pequeño teniendo en cuenta la diversidad del grupo (Teixeira *et al.*, 2012); en ese tiempo se aislaron y caracterizaron 31 lectinas de Rhodophyta y 17 de Chlorophyta. De manera análoga, solo se habían reportado 14 estructuras primarias completas, la primera fue la lectina del alga roja *Bryothamnion triquetum* (BTL) (Calvete *et al.*, 2000). Del mismo modo, se encontró que la lectina de *Hypnea japonica* (HJA) (Hori et al., 2000) tenía similitud con la secuencia de BTL y una lectina de *Bryothamnion seaforthii* (BSL) (L. Do Nascimento

et al., 2012; Medina et al., 2007). Igualmente, tenían peso molecular de 9 kDa, con cuatro cisteínas conservadas y especificidad por carbohidratos complejos, de manera que se encontró la primera familia de lectinas de algas (Chaves, da Silva, Nascimento, et al., 2018).

Actualmente, si bien se han estudiado más especies, se reconoce que son aún muy pocas las lectinas de algas que se han estudiado a un nivel molecular y estructural más específico (Barre et al., 2019, 2020). Los estudios se han centrado en algas rojas, actualmente hay 40 lectinas de Rhodophyta caracterizadas, en contraste con las 20 de Chlorophyta, este número es aún menor respecto a la caracterización estructural, en las que solo para 8 lectinas de algas verdes se ha reportado su estructura primaria (Carneiro et al., 2020), respecto a las de algas rojas se han estudiado principalmente las específicas por manosa, así mismo para la mayoría se ha determinado un patrón de plegamiento Barril- β , como para KAA-2 de *Kappaphycus alvarezii* y GFRT de *Griffithsia* sp. (Figura 1- 3) (Barre et al., 2019, 2020).

Figura 1- 3: Plegamiento Barril- β en el modelo molecular de las lectinas KAA-2 de *Kappaphycus alvarezii* y GFRT de *Griffithsia* sp.



A. GFRT de *Griffithsia* sp., **B.** KAA-2 de *Kappaphycus alvarezii*. Las dos estructuras presentan dos dímeros asociados no covalentemente con un plegamiento de tipo Barril- β I con cuatro sitios de reconocimiento de carbohidratos, GFRT se presenta en complejo con manosa (**M**) y KAA-2 con cadenas de pentamanosidos (**M₅**). Fuente: (Barre et al., 2020).

En general, las lectinas aisladas de algas marinas se caracterizan por sus bajos pesos moleculares, termo estabilidad, baja afinidad por monosacáridos y alta por oligosacáridos y/o glicoproteínas; ausencia de requerimientos de metales para la hemaglutinación (Hori,

et al., 1990; Hori *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2012). Sin embargo, en algas de los géneros *Codium*, *Enteromorpha*, *Ulva* y *Ptilota* hay inhibición por azúcares simples y son dependientes de cationes (Teixeira *et al.*, 2012; Parseptianga, 2015; Hwang *et al.*, 2018a).

A su vez las lectinas de *Hypnea musciformis* (HML) y *Hypnea cervicornis* (HCA) tienen menor similitud en comparación con las secuencias de BTL y HJA; de manera que se cree que pueden conformar una segunda familia de lectinas en algas (Teixeira *et al.*, 2012), con características moleculares similares; tienen 14 cisteínas conservadas, sufren procesamiento postraduccional que involucra escisión proteolítica y unión de cadenas por puentes disulfuro, además de especificidad por residuos de fucosa (Chaves, da Silva, Nascimento, et al., 2018). Otra familia se propuso partir de las lectinas aisladas del género *Eucheuma* (*E. serra*, *E. amakusaensis*, *E. cottonii*), las cuales tienen monómeros alrededor de 28 kDa su secuencia N terminal tiene alta identidad (Kawakubo *et al.*, 1999; Singh & Walia, 2018; Teixeira *et al.*, 2012).

La mayoría de las lectinas aisladas de algas rojas tienen especificidad por N-glicanos, con cuatro dominios de 67 aminoácidos cada uno, y muestran similitud con la lectina aislada de la cianobacteria *Oscillatoria agardhii*, (OAA); se consideran miembros de la familia OAAH a excepción de la griffithsina que de la familia Jacalina. Entre estas lectinas se encuentran las aisladas de *Meristotheca papulosa* (MPA-1), *Agardhiella subulata* (ASL-1, ASL-2), *Kappaphycus alvarezii* (KAA-1, KAA-2), *Kappaphycus striatum*, (KSA-2), *Euchema serra* (ESA), *Eucheuma denticulatum* (EDA) y *Solieria filiformis* (SfL1, SfL-2) (Chaves, da Silva, Nascimento, et al., 2018).

Para algas verdes, la primera secuencia fue determinada para la lectina de *Ulva pertusa* (UPL-1), posteriormente se purificó una lectina de *Bryopsis plumosa* denominada Bryohealin, que tenía baja similitud con las lectinas vegetales, no obstante, era cercana a las lectinas animales con dominios de fucolectina (Tipo F). Por análisis bioinformático se confirmó la presencia del dominio tipo F y una mayor afinidad por GalNAc y GlcNAc (Hidalgo, 2017). De la misma especie se aislaron dos lectinas, específicas por manosa (BPL2) y N-acetil-D-galactosamina (BPL3); las cuales difieren en su estructura primaria. BPL3 es similar a las lectinas tipo H presentes en invertebrados por lo que se considera un ejemplo de evolución cruzada (Hwang *et al.*, 2018b).

Recientemente, se caracterizaron las lectinas de *Ulva fasciata* (UFH), (S. Kumar & Barros, 2020), *Kappaphycus striatus* (KSL), *Kappaphycus striatum* (KSA-2), *Kappaphycus alvarezii* (KAAs) y *Solieria filiformis* (SfLs) (Hung & Trinh, 2020). También se caracterizó una lectina del alga roja, *Amansia multífida* (AmL), para la que se identificó potencial antiinflamatorio, y reducción de la formación de edema en ratones, lo que indica su papel en la modulación de mediadores vasculares en procesos de quimiotaxis que conlleva a la migración de neutrófilos, producción de citocinas proinflamatorias y estrés oxidativo (Mesquita et al., 2021).

Con respecto a las lectinas de algas pardas, hasta el 2016 solo se conocía un reporte para la lectina de *Hizikia fusiformis* (HFL) (Wu et al., 2016). Posteriormente, Fajarningsih et al. (2019) llevaron a cabo la extracción y caracterización parcial de dos lectinas del Phylum Ochrophyta y del género *Padina* (*P. australis* y *P. minor*). Malini et al. (2019) reportaron actividad de lectina en la especie *Colpomenia Sinuosa*. Los estudios en lectinas de algas pardas son muy escasos, dada la dificultad de su aislamiento por la cantidad de polifenoles, polisacáridos u otras moléculas que interfieren durante el proceso, por consiguiente, es importante continuar con sus estudios (Harryson et al., 2018).

En las bases de datos PDB, NCBI y Uniprot se registraron 31 secuencias de lectinas en algas marinas, de las cuales 13 son pertenecientes a 5 especies de algas del Phylum Chlorophyta y 18 lectinas de 12 algas del Phylum Rhodophyta. De los registros mencionados solo siete de las secuencias han sido curadas, UPL-1 de *Ulva pertusa*, SFL-1 y SFL-2 de *S. filiformis*, ESA-2 de *E. serra*, HML de *Hypnea musciformis*, HCA de *H. cervicornis* y Hypnin-A3 de *H. japonica*, todas del Phylum Rhodophyta con excepción de UPL-1 que proviene de un alga verde (**Tabla 1- 3**).

Es preciso señalar que se encuentran catorce (14) secuencias de lectinas de algas rojas, que aún no han sido registradas en las bases de datos disponibles así: siete (7) isolectinas de algas del género *Bryothamnion* (L. Do Nascimento et al., 2012), una (1) lectina de *Grateloupia chiangii* (Hwang et al., 2020a), una (1) de *Meristiella echinocarpa* (MEL), tres (3) de *Euchema amakuensis* y tres (3) de *Agardhiella subulata* (Chaves et al., 2018a). En Colombia, se estudiaron siete especies de todos los Phyla de macroalgas, tres algas verdes (*Bryopsis ramulosa*, *Caulerpa taxifolia* y *Halimeda opuntia*), tres algas pardas (*Turbinaria turbinata*, *Dictyota pinnatifida* y *Sargassum hystrix var buxifolium*) y un alga roja

(*Tricleocarpa cylindrica*). De estas especies *T. cylindrica*, *B. ramulosa*, *D. pinnatifida* y *C. taxifolia* aglutinaron eritrocitos de humano tipo O, mientras que *B. ramulosa*, *D. pinnatifida*, *C. taxifolia* y *S. hystrix var buxifolium* eritrocitos de oveja (Hidalgo, 2017).

De la especie *B. ramulosa* se aislaron dos lectinas, BRL-1 y BRL-2 con especificidad a N-acetilgactosamina y manosa, glucosa y fucosa, respectivamente. BRL-1 tienen un peso molecular de 18,4 kDa en su forma monomérica y 36,2 kDa en la forma dimérica, asociadas por interacciones débiles, por su parte BRL-2 tiene un peso molecular de 15 kDa y se asocia en forma dimérica, trimérica y tetramérica por enlaces no covalentes (Hidalgo, 2017).

Tabla 1- 3: Lectinas de algas marinas registradas y curadas en Uniprot.

| Lectina | Especie | Phylum | Aas en la secuencia | Identificador | Referencia |
|-----------|----------------------------|-------------|---------------------|---------------|--|
| UPL-1 | <i>Ulva pertusa</i> | Chlorophyta | 203 | Q6T6H8.1 | (S. Wang et al., 2004) |
| SFL-1 | <i>Solieria filiformis</i> | Rhodophyta | 267 | C0HL89.1 | (Chaves, da Silva, Nascimento, et al., 2018) |
| SFL-2 | <i>Solieria filiformis</i> | Rhodophyta | 267 | C0HL90.1 | (Chaves, da Silva, Nascimento, et al., 2018) |
| ESA-2 | <i>Eucheuma serra</i> | Rhodophyta | 268 | P84331.1 | (Hori et al., 2007) |
| HML | <i>Hypnea musciformis</i> | Rhodophyta | 90 | P84871.1 | (Nagano et al., 2005a) |
| HCA | <i>Hypnea cervicornis</i> | Rhodophyta | 90 | P84870.1 | (Nagano et al., 2005a) |
| Hypnin-A3 | <i>Hypnea japonica</i> | Rhodophyta | 90 | P85888 | (Okuyama et al., 2009) |

Aas: aminoácidos

Color verde: algas verdes, Color rojo: algas rojas.

En cuanto a sus aplicaciones, por su bajo peso molecular y su carácter menos antigénico, comparado con las de plantas, se emplean en modelos biológicos (Teixeira et al., 2012).

En la **Tabla 1- 4** se reportan algunas de las actividades biológicas presentes en lectinas de algas marinas, la lectina del alga roja *Eucheuma serra* (ESA), induce muerte celular por apoptosis en células de adenocarcinoma de colon (Colo201) mediante la inducción de la caspasa-3 y posterior fragmentación del ADN (Fukuda et al., 2006; Omokawa et al., 2010). Lectinas del género *Bryothamnion*, *B. seaforthii* (BSL) y *B. triquetrum* (BTL), pueden diferenciar variantes celulares de carcinoma humano de colon; además estas lectinas al

unirse a las células tumorales se internalizan por lo que podrían ser modelos para futuras aplicaciones en reparto de fármacos (V. Pinto et al., 2009).

Tabla 1- 4: Lectinas de algas marinas y actividad biológica.

| Alga | Lectina | Actividad Biológica | Referencia |
|---|----------------|---|--|
| <i>Boodlea coacta</i> | BCA | Antiviral - Anti-VIH in vitro células MT-4 (EC50 = 8.2 nM) | (Sato et al., 2011a) |
| <i>Caulerpa cupressoides</i> | CcL | Actividad anti nociceptiva y antiinflamatoria (inhibición enema pata ratón Wistar) | (Vanderlei et al., 2010) |
| <i>Bryopsis plumosa</i> | Bryohealin | Curación de heridas, generación de protoplastos | (Jung et al., 2010) |
| <i>Bryopsis hypnoides</i> | Lectina de BH | Curación de heridas, generación de protoplastos | (Niu et al., 2009) |
| <i>Amansia multifida</i> | LEC | Actividad anti nociceptiva (de origen periférico y central) | (Neves et al., 2007) |
| <i>Eucheuma serra</i> | ESA | Apoptosis en células de adenocarcinoma de colon (Colo201) | (Fukuda et al., 2006) |
| <i>Bryothamnion seaforthii</i> <i>B. Triquetum</i> | BSL/BTL | Diferenciación de variantes de células de carcinoma de colon humano. | (V. Pinto et al., 2009) |
| <i>Gracilaria cornea</i> | GCL | Efecto acaricida sobre <i>Boophilus microplus</i> (reducción peso hembra, masa huevo, periodo eclosión y tiempo supervivencia larval) | (Lima et al., 2005) |
| <i>Griffithsia</i> sp. | GRFT | Antiviral – Inhibe virus VIH (IC50 = 0,4 nM). Coronavirus causante del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Impide unión) | (Alexandre et al., 2010) (Millet et al., 2016) |
| <i>Hypnea cervicornis</i> | HCA | Actividad anti nociceptiva, antiinflamatorio, inhibición de la hipernocicepción inflamatoria (prevención del reclutamiento de neutrófilos) | (Bitencourt et al., 2008; Figueiredo et al., 2010) |
| <i>Hypnea japonica</i> | Hypnin A | Toxicidad frente a líneas celulares tumorales. Unión específica a N-glicanos fucosilados (herramienta valiosa para el diagnóstico del cáncer) | (Okuyama et al., 2009) |
| <i>Kappaphycus alvarezii</i> | KAA-2 | Inhibe infección por virus de influenza. | (Sato et al., 2011b) |
| <i>Tichocarpus crinitus</i> | TCL | Efecto miogénico sobre linfocitos, estimula síntesis de citocinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-6 por células de sangre completa humana. | (Molchanova et al., 2010) |
| <i>Gracilaria fisheri</i> | Extracto crudo | Antibacterial - previene infección por necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en camarones (inhibió tasas de crecimiento de cepas bacterianas (MIC50 = 30-38 $\mu\text{g mL}^{-1}$). | (Boonsri et al., 2016) |
| <i>Pterocliadiella capillacea</i> | PcL | Acciones periféricas con propiedades antiinflamatorias y anti nociceptivas. | (L. Silva et al., 2010) |
| <i>Helminthora divaricata</i> | Extracto crudo | Citotoxicidad sobre MCF-7 y HeLa (14.19 $\mu\text{g/mL}$ (HeLa); 28.54 $\mu\text{g/mL}$ (MCF-7)) | (Anam et al., 2017) |
| <i>Gloiocladia repens</i> | Extracto crudo | Citotoxicidad sobre MCF-7 y HeLa (3.63 $\mu\text{g/mL}$ (HeLa); 12.25 $\mu\text{g/mL}$ (MCF-7)) | (Anam et al., 2017) |

Color verde: algas verdes, Color rojo: algas rojas.

Lectinas de *Amansia multifida* (AML) y *Gracilaria caudata* (GCL), BSL y BTL, inducen la migración de neutrófilos. En cuanto a las lectinas de *Kappaphycus alvarezii* (KAA-2) y *Griffithsia sp.* (GRFT) tienen actividad antiviral con los virus H1N1 y VIH, respectivamente (Alexandre et al., 2010; Millet et al., 2016; Sato et al., 2011b; Teixeira et al., 2012). Otras lectinas aisladas de algas rojas como *Hypnea cervicornis* (HCA), *Pterocladia capillacea* (PcL) y *Caulerpa cupressoides* (CcL) poseen actividad antiinflamatoria (Bitencourt et al., 2008; L. Silva et al., 2010; Vanderlei et al., 2010). La lectina de *Carpopeltis flabellate* (Carnina) tiene actividad mitogénica en linfocitos T de ratón, además inhibe el desarrollo normal del erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus*. También se ha encontrado actividad antibacteriana con *E. serra* (ESA) y *Galaxaura marginata* (GMA) (Fukuda et al., 2006), e inhiben el crecimiento de patógenos en peces como *Vibrio vulnificus*. De forma análoga, BSL y BTL inhiben la adherencia de cepas de *Streptococcus* (V. Pinto et al., 2009; Teixeira et al., 2012) (**Tabla 1- 4**).

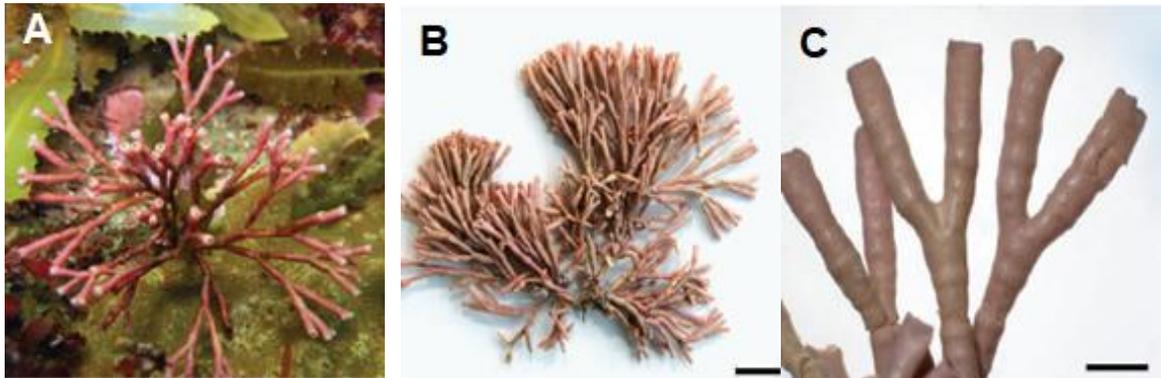
1.3 *Tricleocarpa cylindrica*

Tricleocarpa cylindrica (*T. cylindrica*) ((J.Ellis & Solander) Huisman & Borowitzka 1990), es una especie de alga roja que regularmente habita en profundidades bajas, de 3-10m, preferentemente a 3 m de profundidad (Fricke et al., 2021). Pertenece al género *Tricleocarpa* que se creía comprendía solo dos especies, *T. cylindrica* y *T. fragilis*, pero recientemente se han descubiertos dos adicionales, *T. jejuensis sp. Nov.* y *T. natalensis sp. Nov.*, este género está ampliamente distribuido en el mundo en aguas cálidas y tropicales, se trata de algas rojas calcificadas ramificadas dicotómicamente (Wiryadamrikul et al., 2019).

T. cylindrica suele encontrarse sobre rocas cubiertas de arena en charcos intermareales y en la zona submareal a profundidades máximas de 15 m (**Figura 1- 4a**), se reconoce está distribuida ampliamente en África, Asia, Australasia, Europa, América del Norte y del Sur, y las islas del Pacífico, lo que hace que se considere una especie de distribución amplia en el globo (Huisman, 2006). Esta alga se caracteriza por estar fuertemente calcificada al tener capas de células corticales consideradas gruesas, posee carposporangia a lo largo de la cara interna del pericarpo con parafisis mezclados con filamentos de gonimoblastos. Como plantas gametofíticas poseen alrededor de 7 cm de altura (**Figura 1- 4b**), están ramificadas dicotómicamente (**Figura 1- 4c**), dichas ramificaciones se presentan en

intervalos de 0.2 a 1.2 cm de largo (Wiryadamrikul et al., 2019). Para su identificación se deben tener en cuenta caracteres morfológicos específicos principalmente sobre la composición de las capas celulares y aquellas sobre las estructuras reproductivas, en ciertas ocasiones se requiere apoyo de herramientas moleculares para su clasificación.

Figura 1- 4: *Tricleocarpa cylindrica*



Fuente: extraído de Wiryadamrikul et al. (2019). A. *Tricleocarpa cylindrica* en su ambiente natural sujeta a sustrato rocoso. B. Morfología del espécimen. C. Detalle de las ramificaciones dicotómicas características de esta especie y género.

2.Elaboración de extractos, evaluación de actividad aglutinante y ensayos previos de purificación de la lectina de *T. cylindrica*

2.1 Metodología

2.1.1 Obtención de extractos salinos

La extracción de proteínas se realizó siguiendo la metodología descrita por Hidalgo (2017) a partir del material seco del alga roja *Tricleocarpa cylindrica* (J.Ellis & Solander) Huisman & Borowitzka (Galaxauraceae), la cual se identificó con el Vocher 599058 en el Instituto de Ciencias Naturales-Herbario Nacional Colombiano (Col), (Colecta: mayo 2015 Punta la Loma 11°07'31"N, 74°14'00"W, Zona intermareal). El material se colectó previamente y almacenó a -20°C. Este estudio se encuentra enmarcado en el contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados No. 230, otorgado por el ministerio ambiente y desarrollo sostenible (MADS).

Para la obtención de la harina de alga marina se lavó el material vegetal para la eliminación de epifitas o fauna acompañante y se secó en un horno por dos horas a 37°C, posteriormente se realizó la maceración con nitrógeno líquido del alga seca para la obtención de una harina de alga. Después se realizaron tres lavados con acetona al 97% en un homogenizador manual de embolo (V acetona = 18ml por gramo de material algal) para eliminar pigmentos y lípidos (**Diagrama 2- 1**). Simultáneamente se realizaron ensayos con harina de alga no sometida a tratamiento con acetona, para evaluar si este proceso es importante para la detección de la actividad aglutinante y la purificación de las lectinas.

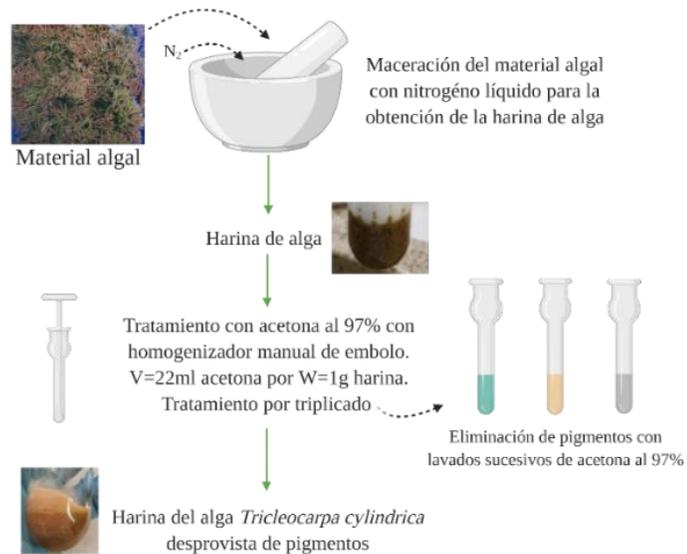
El extracto de proteínas se hizo a partir de 5 g de harina, tratada con acetona y no tratada usando buffer fosfato salino (PBS) 1X (150 mM NaCl, 20 mM fosfatos) pH 7,2 conteniendo 5 mM de tiourea, luego se colocó en agitación constante a 4°C por 24 horas, se centrifugo

por 30 min a 8000 rpm; después el sobrenadante (primer extracto) se separó del pellet. Se adicionó de nuevo buffer de extracción al pellet y se realizó de nuevo la extracción (segundo extracto), el procedimiento se repitió para obtener un tercer extracto. Los tres extractos se reunieron para obtener un pool de extractos (**ETc1**).

El pool de extractos (ETc1) se dializó en una membrana con *Molecular weight* cut-off (MWCO) de 3kDa, realizando tres recambios, dos de agua destilada (1L) y uno con NH_4CO_3 (20 mM) cada 8 h. Finalmente, se evaluaron dos métodos de concentración, liofilización y ultrafiltración en amicon con nitrógeno gaseoso y membrana de 1 kDa (MWCO). Por último, a cada uno de los extractos concentrados se les realizó ensayo de aglutinación, SDS-PAGE y cuantificación.

Se realizaron dos nuevos extractos, **ETc2** a partir de 8.3 g de harina de alga y **ETc3** de 10 g de harina respectivamente; la extracción se realizó con PBS 1X por triplicado como para ETc1, ETc2 se concentró por ultrafiltración (ETc2-U) y se dializo (ETc2-UD), ETc3 se liofilizo (ETc3-L) y dializo (ETc3-DL), estos dos extractos se almacenaron para ser usados en ensayos posteriores.

Diagrama 2- 1: Obtención del extracto algal de *Tricleocarpa cylindrica*.



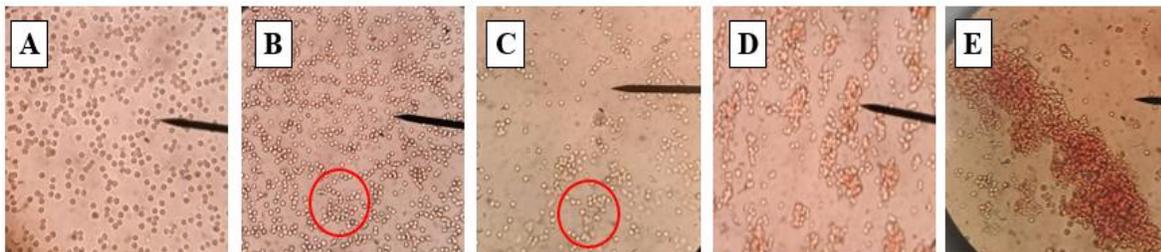
Fuente: diagrama realizado en Biorender®.

2.1.2 Título y actividad aglutinante

Para los ensayos de aglutinación y la determinación del título se usó una suspensión de eritrocitos de humano tipo A, B y O al 2%. En una placa de 96 pozos se adicionaron 50 μ l de PBS 1x, 50 μ l de la suspensión de eritrocitos y 100 μ l de extracto, por duplicado, y un control (buffer); se incubo por 30min a temperatura ambiente (Hidalgo, 2017). Para corroborar los resultados, la hemoaglutinación se verificó con un microscopio óptico a 10 y 40x. La actividad aglutinante se expresó en una escala cualitativa de (-) a (+4) donde este último valor representa la máxima aglutinación (**Figura 2- 1**). El título específico de aglutinación se realizó a partir de diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de los extractos en PBS 1X a un volumen de 100 μ l, luego se adicionaron 50 μ l suspensión de eritrocitos al 2% y se determinó actividad. El título corresponde a la mínima cantidad de proteína requerida para detectar aglutinación.

Si bien para algunas lectinas aisladas de algas marinas se reporta actividad preferente sobre eritrocitos de animales, en este estudio solo se realizó sobre eritrocitos ABH(O) teniendo en cuenta que el extracto crudo de *T. cylindrica* no aglutina eritrocitos animales como los de vaca, oveja o caballo (Hidalgo, 2017).

Figura 2- 1: Escala de actividad cualitativa para los ensayos de eritroaglutinación (40x).



A. Negativo (-). B. (+1). C. (+2). D. (+3). E. (+4). Círculos rojos: grupos de eritrocitos aglutinados.

2.1.3 Cuantificación de proteínas

Se usó el método del ácido bicinonínico (BCA), siguiendo la metodología descrita por Smith et al. (1985). La base del método es la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ en medio básico y la formación de un complejo con el BCA. Como patrón se usó una solución de BSA (albumina sérica bovina) de 0,99 mg/ml.

Debido a la presencia de interferentes en la harina de alga y los extractos crudos iniciales para la determinación de la concentración usando el método de BCA, se realizó como

método alternativo micro-Kjeldahl, el cual permite conocer la cantidad de proteína soluble presente, por la descomposición de la muestra en medio ácido, con ácido sulfúrico en ebullición y un agente reductor catalizador como el cobre. Posteriormente la mezcla se alcaliniza y el amoníaco producido se separa por destilación, el destilado se titula por titrimetría ácido-base. El método de micro-Kjeldahl se reconoce por su alta sensibilidad, aunque requiere de cantidades altas de analito para su desarrollo por lo que no puede ser usado si se tienen cantidades de proteína pequeñas (Thompson et al., 2002). En el **Anexo B** se presenta una muestra de cálculo para este método.

2.1.4 Electroforesis

Se realizó en condiciones no reductoras según lo descrito por Laemmli (1970) en geles del 12,5% de tris-glicina, y lo descrito por Schägger y von Jagow (1987) en geles al 10% de tris-tricina para proteínas de bajo peso molecular. Al extracto (14 μ l) se le adicionó el buffer carga (4 μ l) y se desnaturizó usando calentamiento a 95°C por 5 min. Los geles se fijaron y tiñeron con azul de Coomassie G-250 o tinción de plata siguiendo los protocolos disponibles en el Grupo de Investigación (GRIP).

2.1.5 Aislamiento por precipitación con sulfato de amonio

Se realizó con sulfato de amonio entre 0-50%*s*, 50-70%*s* y 50-80%*s* según la metodología descrita por England & Seifter, (1990), para los extractos concentrados por liofilización (**ETc1-DL**) y ultrafiltración (**ETc1-UD**).

El extracto, **ETc2-UD**, se precipitó de 0-50%*s* y 50-80%*s*. 291g sulfato de amonio se maceraron y adicionaron lentamente a 1L de extracto para alcanzar una saturación inicial de 0-50%*s*. La precipitación se hizo a 0°C, una vez adicionada toda la sal, el extracto se dejó en reposo toda la noche, posteriormente se centrifugó (8000 rpm, 30min) y el pellet se resuspendió en PBS 1X. El sobrenadante se llevó a un porcentaje de saturación del 50 a 70 %*s* (para ETc1) o 50-80 %*s* (para ETc2), adicionado 125 g o 194 g de sulfato de amonio macerado por litro de extracto. Se repitió el procedimiento descrito, dejando la precipitación en reposo y separando el pellet de proteínas del sobrenadante por centrifugación.

2.1.6 Cromatografía de intercambio iónico

En **columna abierta** se empleó una columna de 2 mL de DEAE-Sephadex A-50 con un flujo de 0,5ml/4min, la separación se hizo con un gradiente discontinuo. En primer lugar, se sembraron 6 ml del extracto dializado y concentrado por ultrafiltración (ETc2-UD) (1,4 mg/ml proteína). La fracción no retenida (FNR) se eluyó en buffer de equilibrio PBS 1X pH 7.2 (Na_2HPO_4 0.2 M, NaH_2PO_4 0.2 M, NaCl 150 mM), y la fracción retenida (FR) con el mismo buffer conteniendo NaCl 1 M. Las fracciones de mayor absorbancia se colectaron en un pool para determinar actividad aglutinante, concentración de proteínas y SDS-PAGE. Este mismo procedimiento se llevó a cabo sembrando 5,5 ml de la fracción activa aislada por fraccionamiento F 50-80%_s del extracto ETc3-DL (2,25 mg/ml proteína), se realizó una cromatografía de intercambio adicional sobre un soporte DEAE-Sepharosa, con las mismas condiciones de elución mencionadas y usando una muestra activa F 50-80%_s dializada sin concentrar.

Para separación usando el sistema **FPLC** se utilizó un equipo Akta STAR[®] y una columna HiTrap Q HP (de 1ml, intercambiador aniónico fuerte), la fracción no retenida se eluyó con PBS 1X con 8 volúmenes de columna (VC) (con un equilibrio previo de 5 VC), para eluir la fracción retenida se hizo un gradiente de fuerza iónica discontinuo con cloruro de sodio (NaCl 1M) del 20%, 30% y 40% de B cada porcentaje se eluyó con 10 VC, la presión máxima permitida por la columna se fijó en 0.3MPa y se utilizó un flujo de 1ml/min. La muestra utilizada para FPLC fue la fracción no retenida resultante de la cromatografía en columna abierta con DEAE-Sephadex A-50.

2.2 Resultados y Análisis

2.2.1 Obtención de extractos desprovistos de pigmentos

El extracto proteico ETc1 de *T. cylindrica* se obtuvo a partir de 5g de harina de alga con un volumen final de 157.5ml para el pool de las tres extracciones, Para los demás extractos, el volumen final del pool fue de 200 y 271 ml para ETc2 y ETc3, respectivamente (**Tabla 2- 1**).

Tabla 2- 1: Extractos de la harina de *Tricleocarpa cylindrica*.

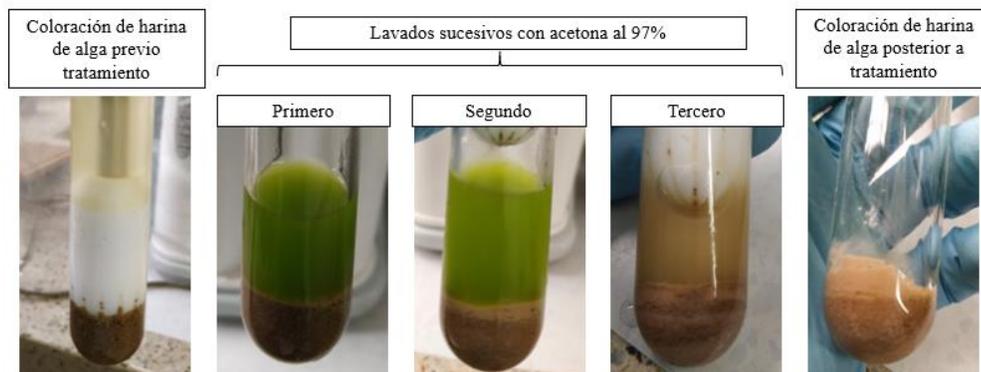
| Extractos Totales | Harina (g) | Volumen total (ml) | Acetona requerida (ml)** |
|-------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| ETc1 | 5.0 | 157.5 | 90 |
| ETc2 | 8.3 | 200 | 150 |
| ETc3 | 10.0 | 271 | 180 |

** : 3 strokes por gramo de harina de alga. ND: no determinado.

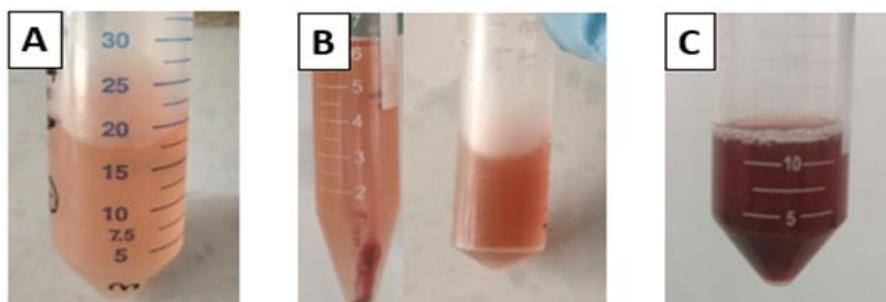
Antes de la extracción se realizó tratamiento con acetona al 97% por triplicado, durante cada lavado se colocó 1 g de la harina en el homogenizador de embolo y se realizaron 3 strokes con 6 ml de acetona (18 ml de acetona requeridos para el lavado de 1g de harina); durante el tercer lavado se observó la disminución de los pigmentos dada por la coloración clara (tercero), lo que nos permitió determinar el número de lavados necesarios para tener la harina final a la que se le realizó la extracción (**Figura 2- 2**).

Es importante resaltar que el procedimiento es lento usando el homogenizador manual, de modo que el tratamiento de 5g de harina requirió alrededor de 10 horas de trabajo. El ETc1 final presentó una coloración rosa debida a los pigmentos constituyentes de este tipo de algas del Phylum Rodophyta que no son eliminados con el tratamiento de acetona (**Figura 2- 3**).

Figura 2- 2: Harina de alga proveniente de *T. cylindrica* y eliminación de pigmentos



18 mL acetona al 97% se usaron para tratar 1g de harina. Se evidenció la eliminación de pigmentos durante el proceso.

Figura 2- 3: Coloración de los extractos obtenidos de la harina de alga de *T. cylindrica*.

A. pool de extractos ETc1. **B.** Extracto concentrado por liofilización, se observa un precipitado color rosa oscuro. **C.** Extracto concentrado 10 veces por ultrafiltración.

Por otra parte, los ensayos de actividad aglutinante con el extracto (**ETc-Nt**) sin tratamiento con acetona, mostraron hemólisis de los eritrocitos con cantidad de proteína mayores a 2000 μg (**Tabla 2- 2**), por consiguiente, el tratamiento con acetona es importante para la detección de la actividad y la eliminación de interferentes que podrían ocasionar la lisis celular.

Tabla 2- 2: Extractos de *Tricleocarpa cylindrica* con y sin tratamiento con acetona.

| Extracto | ml | mg/ml | mg totales | Actividad sobre eritrocitos O | Agglutinación# (μg) |
|----------|-------|-------|---------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| ETc-Nt | 81 | 23.4 | 1894.2 | H | 2340 |
| ETc1 | 147.5 | 20.4 | 3210.2 | \pm | 2040 |
| ETc2 | 200 | 12.8 | 2552.0 | ++ | 1280 |
| ETc3 | 271 | 6.92 | 1875.3 | ++ | 692 |

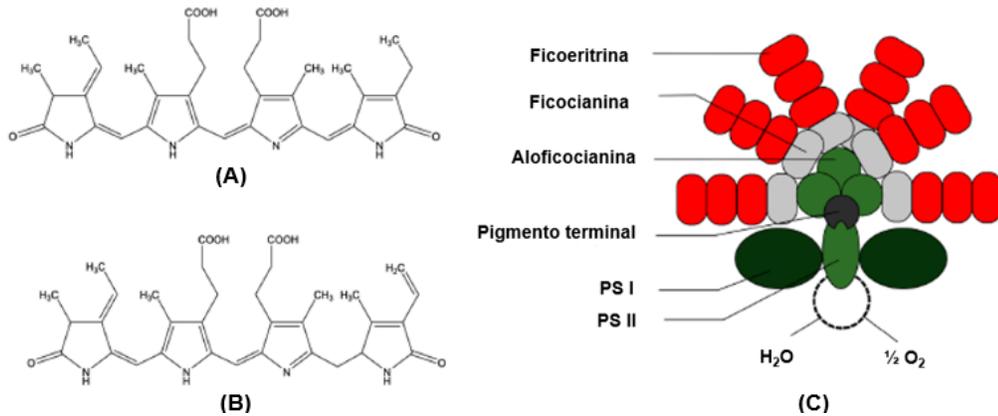
H: hemólisis. Nt: no tratado con acetona al 97%. μg : microgramos totales usados para la detección de actividad aglutinante. Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación]. # Cantidad de proteína empleada para la aglutinación.

Estos resultados corroboran observaciones previas con extractos de otras especies de algas marinas (Hidalgo, 2017); además la acetona se emplea rutinariamente para la extracción de los diferentes pigmentos constituyentes de algas marinas, que son usados en la industria de alimentos, cosmética, farmacéutica, etc. Al respecto se conocen tres clases de pigmentos, las clorofilas, pigmentos involucrados en fotosíntesis, no polares, que pueden ser extraídos con DMF (N,N-dimetilformamida), metanol, etanol o acetona. Hay cuatro tipos, Clorofila A, B, C (C1 y C2) y D, ubicuas en los diferentes Phyla de algas marinas, pero en algas rojas, solo se presenta la Clorofila A y D. Otra clase son los carotenoides involucrados en fotoprotección, que son de tipo no polar y suelen extraerse

con DMSO (dimetilsulfóxido); análogamente, existen dos tipos, carotenoides y xantofilas, encontrados principalmente en algas pardas (Alam, 2018; Osório et al., 2020; Vimala, 2015; Wiltshire et al., 2000).

De forma similar, las ficobilinas están unidas a proteínas formando complejos proteicos denominados ficobilisomas (**Figura 2- 4**), son polares, y se pueden extraer usando buffer fosfato, se dividen en cuatro tipos, ficoeritrina (morado), ficocianina (azul), aloficocianina (verde azulado) y ficoeritrocianina (morado). Esta clase de pigmentos predomina en algas rojas representando del 40-50% del contenido de pigmentos y proteínas (Alam, 2018; Osório et al., 2020; Vimala, 2015; Wiltshire et al., 2000). En este caso, con el uso de acetona se eliminaron la mayoría de interferentes, como se observa en los extractos a medida que disminuye la coloración (**Figura 2- 4**), sin embargo el color rosa obtenido para el extracto podría deberse a las ficobiliproteínas, que como se mencionó son el constituyente proteico y pigmentario dominante en Rhodophyta; por su naturaleza proteica y polar no son fácilmente eliminadas con el uso de la acetona y durante la extracción con PBS 1X forman complejos con otras proteínas que hacen difícil su eliminación (Osório et al., 2020).

Figura 2- 4: Estructura de las ficobilinas y conformación del ficobilisoma en las ficobiliproteínas de algas marinas.



Ficobilinas presentes en algas rojas ficoeritrina (A) y ficocianina (B) (Osório et al., 2020). Ficobilisoma (C) (Alam, 2018).

Algunos métodos para la extracción de ficobilinas implican tratamientos a bajo pH que podría afectar la actividad de las lectinas de interés, aunque este tipo de aproximaciones se han usado en el aislamiento de la lectina de *Hypnea cervicornis* (HCA), haciendo tratamiento del extracto con HCl pH 1.0 por 5 horas a 4°C. El tratamiento permite eliminar

algunos de estos interferentes, y no afecta la actividad de la lectina dada su estabilidad en un amplio rango de pH (Nagano et al., 2005a).

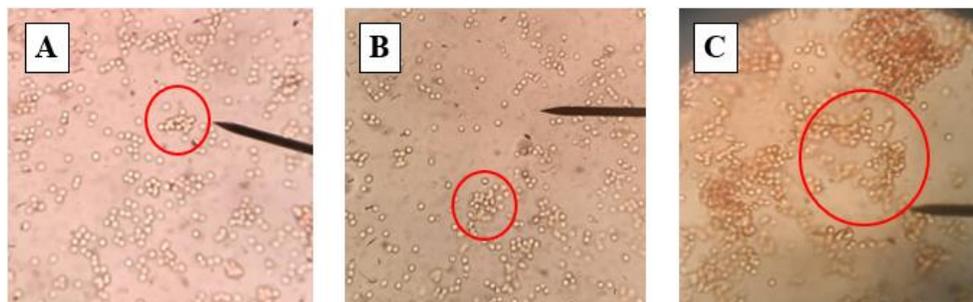
Adicionalmente al uso del pH para la extracción de ficobiliproteínas, un método adicional emplea la asolectina-CHAPS ((3-((3-colamidopropil) dimetilamonio)) como solución de extracción, seguida de tres ciclos de congelación, descongelación y sonicación, comparado con la extracción con PBS 1X, se eliminan 100% de los pigmentos (Zimba, 2012). Del mismo modo, en otros estudios por medio de cromatografía de intercambio iónico se eliminan estos interferentes como en el caso de los extractos de *Hypnea musciformis* (Nagano et al., 2005b), y *Bryothamnion triquetrum* (Fontenelle et al., 2018).

Los resultados del proceso de extracción (**Figura 2- 2**) demostraron que para la *T. cylindrica* es importante el lavado con acetona, de esta forma, los extractos no generan hemólisis de los eritrocitos durante los ensayos de actividad. Por su parte, los extractos obtenidos permiten llevar a cabo métodos de purificación posteriores para aislar la (s) lectina (s).

2.2.2 Actividad aglutinante sobre eritrocitos ABO de humano

Los estudios iniciales para detectar actividad de lectina se hicieron con el extracto de *T. cylindrica* (ETc1) usando eritrocitos tipo O+, sin embargo, con cantidades de 280 µg y 1250 µg de proteína total no se obtuvo aglutinación; mientras que estudios previos mostraron aglutinación con 9 µg de proteína total Hidalgo (2017). Debido a esto, se preparó un nuevo extracto (ETc2) con 8.3 g de harina tratada con acetona, y se encontró actividad moderada (+2) para los eritrocitos de tipo A (GalNAc α 1,3(Fuc α 1,2)Gal β 1-R) y O (Fuc α 1,2Gal β 1-R), y fuerte (+4) para el tipo B (Gal α 1,3(Fuc α 1,2) Gal β 1-R), en los tres casos se observan residuos de Galactosa terminales que pueden estar implicados en la interacción con la lectina (**Figura 2- 5**).

Figura 2- 5:Ensayos de eritroaglutinación usando suspensiones de eritrocitos al 2% de los grupos sanguíneos ABO (observación a 40x) (ETc2-UD).



A. Eritrocitos tipo A con aglutinación moderada (+2). **B.** Eritrocitos tipo O con aglutinación moderada (+2). **C.** Eritrocitos tipo B con aglutinación fuerte (+4). Círculo rojo: grupos de eritrocitos aglutinados.

De otra parte, los títulos de aglutinación del extracto (ETc2-UD) mostraron que la cantidad de proteína mínima para observar aglutinación fue 17.5, 1.1 y 0.5 μ g, para los grupos A, O y B, respectivamente (**Tabla 2- 3**), donde se evidenció que hay una mayor especificidad por los glicotopes presentes en los eritrocitos B con respecto a los eritrocitos O y A. Por consiguiente, los ensayos de actividad aglutinante durante las diferentes etapas de purificación se llevaron a cabo preferentemente con eritrocitos tipo B.

Tabla 2- 3: actividad aglutinante sobre eritrocitos ABO extractos de *T. cylindrica*.

| Extracto | mg/ml | Eritrocitos O | Eritrocitos A | Eritrocitos B | Aglutinación (μ g) [#] |
|---------------------|-------|---------------|---------------|---------------|--------------------------------------|
| ETc1* | 20.4 | ± | ND | ND | 2040 |
| ETc2-UD** | 1.4 | ++ | ++ | ++++ | 140 |
| Título (μ g) # | | 17.5 | 1.1 | 0.5 | --- |

ND: no determinado. En paréntesis se indica el título de aglutinación en μ g. *: corresponde a un volumen de 100 μ l para el ensayo. Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación]. # Cantidad de proteína empleada para la aglutinación.

Estudios similares, han mostrado que generalmente, las lectinas de algas marinas no aglutinan de eritrocitos tipo B; preferentemente aglutinan eritrocitos tipo O y A. Los primeros estudios para detectar lectinas en algas marinas fueron realizados por Boyd et al., (1966); quienes evaluaron extractos obtenidos de veintinueve (21) especies de todos los Phyla, pero no encontraron aglutinación con eritrocitos tipo B. En el caso de las lectinas aisladas de algas rojas presentan aglutinación preferente sobre eritrocitos de oveja y conejo (Singh & Walia, 2018).

En otros estudios se postula que las lectinas de algas rojas no presentan especificidad por ningún grupo sanguíneo, aunque, las lectinas de *Ptilota plumosa* y *Gymnogongrus crenulatus* aglutinan el grupo sanguíneo B (Ingram, 1985; Sampaio et al., 2002), además con las especies *Laurencia undulata* (Hori et al., 1981) y *P. plumosa* se reconoce, tal como sucede con *T. cylindrica*, que presentan capacidad de aglutinar eritrocitos de humano A, B y O con extracto crudo, sin embargo a medida que la lectina se va purificando se intensifica su actividad por eritrocitos tipo B (Singh et al., 2015). Lo anterior se observó en este trabajo, dado que el precipitado obtenido con sulfato de amonio mostró preferencia por eritrocitos de tipo B. Otro factor importante, es que, en los extractos crudos, existen pigmentos naturales, los cuales pueden generar aglutinación muy débil, dada por agregados o grupos muy pequeños de eritrocitos, de manera que cuando son eliminados del extracto se observa aglutinación solo dada por las lectinas.

2.2.3 Cuantificación de proteínas

La determinación de la concentración en cada una de las etapas de purificación se llevó a cabo por medio del método del ácido bicinconinico (BCA), sin embargo, en algunos casos, como para los pools de extractos, hubo una subestimación por lo tanto se empleó el método de micro-Kjeldahl, al igual que para la determinación de proteína en la harina de alga (**Tabla 2- 1**).

Se encontró un porcentaje mayor para la harina de alga no tratada con acetona, con $6.2 \pm 0.2\%$ respecto a la harina tratada con acetona $4.6 \pm 0.3\%$, esta diferencia puede estar debida a la eliminación de algunos pigmentos proteicos, como se mencionó anteriormente, los cuales pueden extraerse con este solvente, además de otros compuestos con nitrógeno no proteico presentes en el extracto crudo (Osório et al., 2020; Vimala, 2015), no se presentan reportes de otras harinas de algas en las mismas condiciones, sin embargo, se considera que el porcentaje de proteínas en algas es bajo respecto a otros constituyentes (Rozo, 2019). En lo que respecta al porcentaje de proteína soluble en el extracto de harina tratada con acetona, para ETc1 se determinó un $2.95 \pm 0.25\%$, lo que indica que en 5 g de harina solo 0.46 g (9.2%) corresponden a proteína que se extrae en solución salina.

Tabla 2- 4: Cuantificación de proteínas en extractos del alga *T. cylindrica* usando el método de micro-Kjeldahl.

| Extracto/Harina | ml | %Proteína | mg/ml (μ -Kjeldahl) | mg (μ -Kjeldahl) [#] | mg/ml BCA | mg (BCA) [#] |
|-------------------------------|-------|------------------|-----------------------------|---------------------------------------|--------------|--------------------------|
| ETc1 | 157.5 | 2.95 \pm 0.25* | 5.9 | 929.3 | 20.4 | 3213 |
| Harina No Tratada Δ | NA | 6.2 \pm 0.20** | NA | NA | NA | NA |
| Harina Tratada Δ | NA | 4.6 \pm 0.30** | NA | NA | NA | NA |

*n=2 **; n=4, #;mg totales, Δ : Para los 5 g de harina de *Tricleocarpa cylindrica* usada en la primera extracción ETc1. NA: no aplica. % Proteína: porcentaje de proteínas solubles.

Estos dos métodos de cuantificación son frecuentemente empleados, BCA en medio básico forma un complejo con el Cu⁺ reducido; lo anterior se da por los enlaces peptídicos, y residuos de cistina, cisteína, triptófano y tirosina. Es un método sensible, aunque presenta interferentes, tales como agentes quelantes, reductores como el DTT, azúcares etc; sin embargo por diálisis se pueden eliminar algunos interferentes (Goldring, 2012; Hayes, 2020; Stepanchenko et al., 2011). Una desventaja radica en su carácter destructivo, la proteína después de reaccionar con el cobre no puede ser usada en ensayos subsecuentes (Goldring, 2012), se creía que otra desventaja era los largos tiempos de incubación a temperatura ambiente que tenían un rango de 2 horas, esto se optimizó utilizando calor, a 37°C por una hora, y más recientemente con estudios específicos sobre la cinética de los aminoácidos implicados en la interacción con el BCA se ha reportado como dicho tiempo puede disminuirse a hasta 15 minutos para muestras concentradas o en las que la absorbancia del complejo a 562nm sea superior a 0.1, actualmente se considera un método eficaz para la determinación de este parámetro en mezclas complejas de proteínas (Cortés et al., 2020; Stepanchenko et al., 2011).

En lo que respecta al método de Kjeldahl, este es aún considerado como el de referencia, se determina el nitrógeno total; una ventaja es el uso de la muestra soluble, o sólida, adicionalmente si es insoluble se puede analizar por espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) (Sáez et al., 2013). Es un método destructivo y requiere grandes cantidades que por lo general no están disponibles, su uso está asociado a factores de conversión de nitrógeno a proteínas que si bien han sido ampliamente estudiados para muestras de alimentos, para otras no hay reportes, esto implica una disminución en la precisión de la determinación pues se debe usar un valor de referencia de 6.25 que puede o no estar en concordancia con la composición de la muestra, por su parte, establecer estos factores es difícil pues debe hacerse para especies individuales, e incluso se reporta variación en los

índices entre especies recolectadas o cultivadas bajo condiciones ambientales diferentes (Lourenço et al., 2002; Sáez et al., 2013).

Un ejemplo de lo anterior se presenta por Lourenço y otros (2002) en los que reportan como el valor de 6.25 es inadecuado para la determinación de nitrógeno total en algas marinas, teniendo en cuenta su composición de aminoácidos, reportan valores promedio de 5.13, 5.38 y 4.59 para algas verdes, pardas y rojas, respectivamente, dando como resultado un factor promedio general de 4.92, cabe resaltar que el menor valor del factor en algas rojas está asociado a la presencia de nitrógeno no proteico (NNP), presente en pigmentos, como la clorofila o ficoeritrina, o compuestos inorgánicos como nitratos y demás que generan subestimación usando el factor de referencia de 6.25 (Hayes, 2020; Lourenço et al., 2002). Además de la presencia de NNP, la composición de aminoácidos ricos en nitrógeno como arginina, que es uno de los aminoácidos predominantes en algas rojas, tienden a disminuir los valores de estos factores de conversión (Lourenço et al., 2002). En el caso de este estudio se utilizó el factor de 4.59, y debido a limitaciones en cuanto a cantidad de muestra solo se realizó la determinación con Kjeldahl para la harina y pool de extractos inicial (**Tabla 2- 4**).

Las diferencias en concentración en los dos métodos (5.9 y 20.4 mg/ml para micro-Kjeldahl y BCA, respectivamente) indican como para con BCA se sobreestima la concentración en ~3.6 veces (**Tabla 2- 4**), esto puede deberse a interferentes presentes en los extractos crudos como carotenoides, polifenoles, esteroides, carbohidratos o vitaminas, que podrían estar involucrados en la determinación de la concentración; para algunas algas como *Ulva pertusa*, se ha reportado un contenido alto antioxidantes, que podrían interferir en la determinación de la concentración por BCA (Kelman et al., 2012; Sansone & Brunet, 2020). Las algas marinas son una fuente de antioxidantes reconocida, presentan ascorbato (vitamina C) y ciertos solutos compatibles (osmoprotectores), α -tocoferol soluble en lípidos (vitamina E), carotenoides como la astaxantina, aminoácidos similares a las micosporinas, otros compuestos fenólicos, como halofenoles y florotaninos o alginatos y polisacáridos sulfatados que también eliminan radicales libres (Wells et al., 2017), su proporción depende del Phylum, por ejemplo los florotatinos son dominantes en algas pardas.

En algas se reconocen ciertos factores que regulan la producción de metabolitos asociados como las proteínas, estos son factores bióticos como el estado de crecimiento, abióticos como disponibilidad de nutrientes, temperatura, salinidad, intensidad de luz, etc., y

finalmente, la dinámica algal asociada, de organismos presentes en el ecosistema, por ejemplo en el caso de la salinidad hay una correlación directa, un aumento tiene efectos negativos en la fotosíntesis lo que disminuye la producción de proteínas e incrementa la presencia de nitrógeno no proteico (Kelman et al., 2012; Yang et al., 2021).

Cabe resaltar que dichos factores varían con la época del año por lo que es importante tener presentes las condiciones en la época de recolección de la muestra para analizar su contenido de metabolitos, en el Caribe colombiano específicamente para Santa Marta hay una época seca general de diciembre-junio en la que se presentan pocas lluvias pero hay fenómenos como la surgencia de aguas ricas en nutrientes, la época lluviosa por su parte comprende los meses de septiembre a octubre, las lluvias generan escorrentía de sedimento y nutrientes lo que implica un aumento de turbidez del agua (Mancera et al., 2013; Ramírez et al., 2010), las muestras de *T. cylindrica* fueron colectadas en la época seca (mayo), en esta generalmente la salinidad aumenta respecto a la época lluviosa y el contenido de clorofila disminuye (Ramírez et al., 2010), como se mencionó afecta la captación de nitrógeno y disminuiría la cantidad de proteínas.

Además, particularmente en algas rojas se han reportado porcentajes de proteína inferiores al 50% (entre 10-47%), así mismo se registran diferencias en contenido proteico para algas de la misma especie debidas a los cambios estacionales, y los factores mencionados, al régimen mareal, por ejemplo, en el alga roja *Hypnea musciformis* hay diferencias en el contenido de proteínas incluso a lo largo del año (Rozo, 2019).

Como generalidad se reconoce que el contenido proteico en algas verdes y rojas es superior al de pardas (**Tabla 2- 5**), adicionalmente, estudios que relacionen el porcentaje de proteínas con la estacionalidad han evidenciado una relación entre los periodos de verano, que generalmente presentan limitación de nutrientes, con disminución en la producción de proteínas e incluso cambios en la composición de aminoácidos (Bleakley & Hayes, 2017; Wells et al., 2017), por ejemplo, para *Palmaria palmata* el porcentaje de proteína en verano es de ~15% y en invierno de ~23% (Kjeldhal) (Galland et al., 1999).

El bajo porcentaje de proteínas solubles en extracto (ETc1) de *T. cylindrica* de $2.95 \pm 0.3\%$ comparado con el reportado para otras algas rojas es muy bajo (**Tabla 2- 5**), lo que podría estar relacionado a una limitación de nutrientes debido a la época de recolección del alga, para otras algas marinas colectadas en Colombia también se han reportado valores bajos, desde $0.36 \pm 0,04\%$ para el extracto de *Sargassum hystrix var buxifolium* y hasta $3.22 \pm 0,26$ para *Bryopsis pumosa* (Hidalgo, 2017).

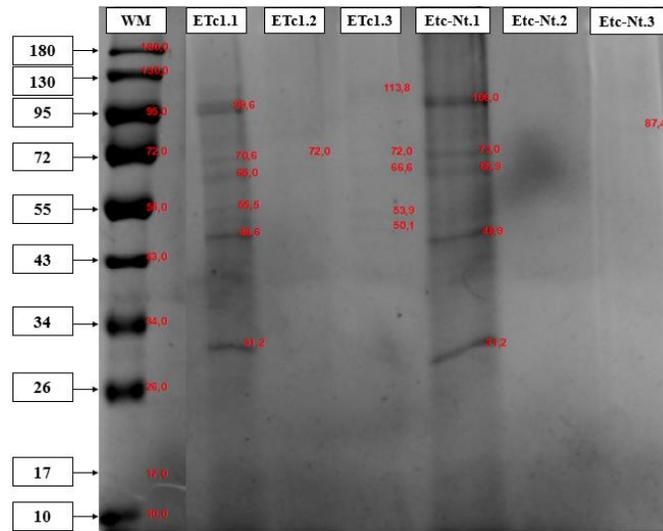
Tabla 2- 5: Contenido de proteína extractos proteicos de algas marinas.

| Alga | %Proteína | Alga | %Proteína ¹ |
|-----------------------------|-----------|-----------------------------|------------------------|
| <i>Porphyra tenera</i> | 47.5 | <i>Eisenia bicyclis</i> | 13.1 |
| <i>Grateloupia turuturu</i> | 20.0 | <i>Undaria pinnatifida</i> | 12.5 |
| <i>Palmaria palmata</i> | 18.3±5.9 | <i>Laminaria digitata</i> | 6.9±1.1* |
| <i>Codium fragile</i> | 15.6 | <i>Laminaria hyperborea</i> | 6.8±1.3* |
| <i>Ulva pertusa</i> | 17.5 | <i>Saccharina latisima</i> | 7.1±1.7* |
| <i>Laminaria japonica</i> | 15.6 | <i>Alaria esculenta</i> | 11.0±1.4* |

Fuente: (Galland et al., 1999; Schiener et al., 2014). *: %Proteína determinado por el método de Lowry, 1: micro-Kjeldahl. Color verde: algas verdes, Color rojo: algas rojas, Color café claro: pardas.

Se evaluó cada una de las extracciones obtenidas del extracto ETc1 por SDS PAGE, para la primera extracción Etc1.1 (20.46 mg/ml) se observaron aproximadamente seis (6) bandas alrededor de 98.6, 70.6, 65, 55.5, 48.6 y 31.2 kDa, para la segunda ETc1.2 (16.11 mg/ml) y tercera ETc1.3 (14.32 mg/ml) se observaron bandas con menor intensidad en 72, 66, 53.9 y 50 kDa, que indica que estas proteínas están en mayor cantidad en el extracto proteico, los extractos se dializaron previamente a la electroforesis. Para el extracto crudo, ETc-Nt, el bandeo fue similar, 106, 87, 73, 67, 49kDa, en estos se evidencia como para el extracto no tratado con acetona hay un mayor background (**Figura 2- 6**), esto es debido a que en el extracto crudo se presentan numerosos componentes que pueden interferir en la electroforesis, como polisacáridos, lípidos, pigmentos, carbohidratos (alginatos, celulosa), antioxidantes, entre otros (Wells et al., 2017).

Figura 2- 6: SDS-PAGE +Δ -DTT para pool de extractos tratados (ETc1) y no tratados con acetona (ETc-Nt).

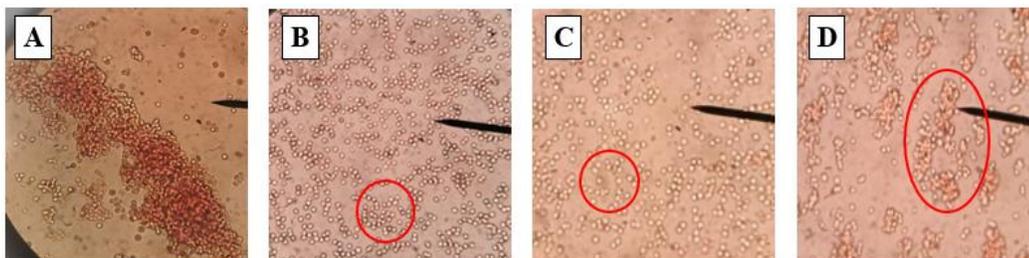


ETc1.1: extracción uno de la harina tratada con acetona (TAc) (8,6µg). **ETc1.2:** extracción dos de la harina TAc (9,7µg). **ETc1.3:** extracción tres de la harina Tac (7,5µg). **Etc-Nt.1:** extracción uno de la harina no tratada con acetona (Nt) (10,3µg). MW: marcador de peso molecular.

2.2.4 Precipitación con sulfato de amonio

El extracto ETc1 se dividió en dos partes para evaluar los métodos de concentración, uno por ultrafiltración y diálisis **ETc1-UD**, y por diálisis y liofilización **ETc1-DL**. Estos extractos se llevaron a precipitación usando sulfato de amonio donde se encontró actividad de aglutinación en las fracciones del 50-70% y el sobrenadante (**Figura 2- 7**) (**Tabla 2- 6**).

Figura 2- 7: Ensayos de eritroaglutinación con eritrocitos B al 2% para fracciones de la precipitación con sulfato de amonio de ETc1.



A y B: ETc1-DL. A. 50-70% aglutinación (+4) (83µg), **B.** Sobrenadante aglutinación (±) (200µg). **C y D: ETc1-UD. C.** 50-70% aglutinación (+2) (9 µg), **D.** Sobrenadante aglutinación (+3) (88µg). µg: cantidad total de proteína. Círculo rojo: eritrocitos aglutinados.

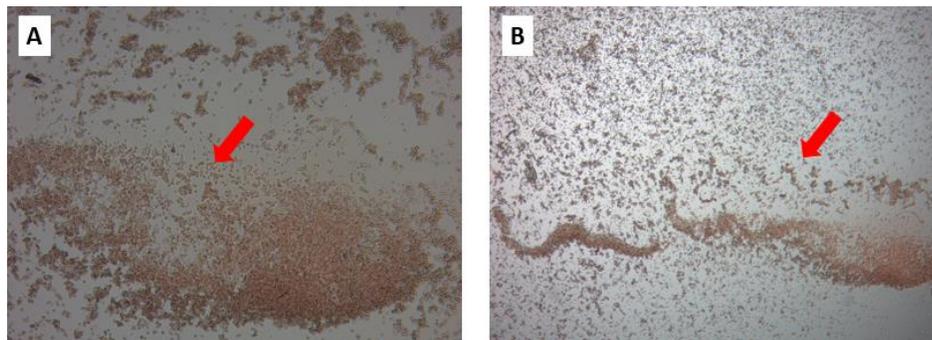
Tabla 2- 6: Extractos utilizados para el aislamiento con sulfato de amonio y fracciones resultantes.

| Extracto | ml | mg/ml | mg totales | Eritrocitos tipo O | Eritrocitos tipo B | Aglutinación (μ g) # |
|-------------------------|-------|-------|---------------|-----------------------|-----------------------|------------------------------|
| ETc1 | 157.5 | 20.4 | 3210.2 | ± | ND | 2040 |
| ETc1-UD | 12.0 | 12.5 | 150.5 | + | ++++ | 1250 |
| F 0-50% _s DL | 1.0 | 0.60 | 0.6 | - | - | 60 |
| F50-70% _s DL | 1.0 | 0.10 | 0.1 | - | ++ | 10 |
| Sobrenadante DL | 1.0 | 0.90 | 0.9 | - | +++ | 90 |
| ETc1-DL | 6.0 | 2.80 | 16.8 | + | ND | 280 |
| F 0-50% _s DL | 1.0 | 0.90 | 0.9 | - | - | 90 |
| F50-70% _s DL | 1.0 | 0.80 | 0.8 | - | ++++ | 80 |
| Sobrenadante DL | 1.0 | 2.00 | 2.0 | - | + | 200 |
| ETc2 | 200.0 | 12.8 | 2252.0 | + | ++ | 1280 |
| ETc2-UD | 16.0 | 1.40 | 22.4 | ++ | ++++ | 140 |
| F 0-50% _s D | 8.8 | 0.45 | 3.96 | ND | - | 45 |
| F50-80% _s D | 10.5 | 0.54 | 5.67 | ND | ++++ | 54 |
| Sobrenadante D | 7.5 | 0.05 | 0.38 | ND | - | 4 |

DL: Dializado y liofilizado. **UD:** ultrafiltración y diálisis. **D:** diálisis. **ND:** no determinado Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación]. # Cantidad de proteína empleada para la aglutinación.

Los resultados de actividad aglutinante mostraron que la (s) lectina (s) se encuentran en la fracción 50-70%_s y en el sobrenadante, por lo que se realizó un ensayo adicional con el extracto ETc2-UD precipitando entre el 50-80%_s; donde se obtuvo actividad aglutinante (+4) con 54 μ g de proteína total (**Figura 2- 8**), las fracciones del 0-50%_s y el sobrenadante no aglutinaron (**Tabla 2- 6**). Es importante resaltar que en todos los casos la cantidad de proteína inicial para el extracto precipitado fue diferente en cada uno, además la cantidad de proteína total obtenida en todas las fracciones fue menor (**Tabla 2- 6**). Esto se puede explicar porque todas las fracciones se sometieron a un proceso de diálisis extenso para asegurar la eliminación de sales, y otros compuestos de menor tamaño presentes en los extractos; o por adsorción de las proteínas a la membrana.

Figura 2- 8: Ensayos de eritroaglutinación con eritrocitos B al 2% para la fracción 50-80% obtenida del extracto ETc2-UD (10X) (54 µg).



A.40x. **B.** 10x. µg: cantidad total de proteína. Aglutinados se muestran con una flecha roja.

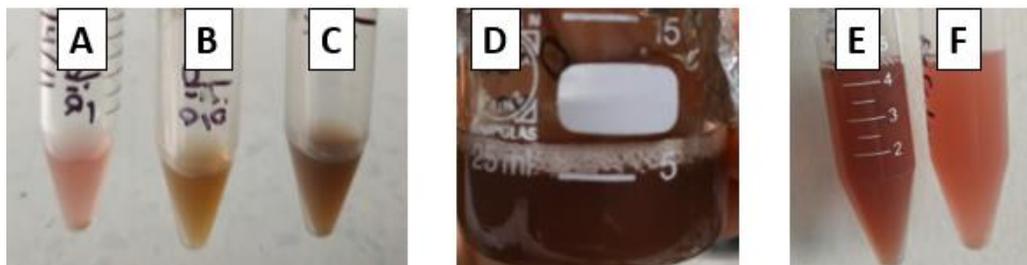
La precipitación con sulfato de amonio es ampliamente utilizada en la purificación de proteínas, esta tiene como principio la reducción de su solubilidad usando sales que generan su precipitación y facilitan su aislamiento (salting out) (Wingfield, 1998), se presentan tres interacciones principales, hidratación de iones entre los residuos de aminoácidos cargados como el Glutamato o la Lisina, formación de puentes de hidrógeno entre los grupos polares y el agua para la cadena principal de todos los residuos, y la hidratación hidrofóbica relativa a los aminoácidos apolares, que implica una pérdida de entropía o movilidad de las moléculas de agua cuando están en cercanía de estos residuos, así, la conformación de aminoácidos de la proteína y su enrollamiento son determinantes en su solubilidad, esta característica específica permite un aislamiento satisfactorio en etapas de purificación temprana al eliminar proteínas que se agregan fácilmente de las que son muy solubles (Duong & Gabelli, 2014; Wingfield, 2001, 2016).

Sumado a lo anterior el pH y temperatura pueden ser importantes, por ejemplo, si se conoce el punto isoeléctrico (pI) de la proteína a ensayar, se puede variar el pH de la muestra en cambios no abruptos de 0.5 a 1 unidades, así el salting out puede ser más eficaz en los coprecipitados con SO_4^{2-} , por lo que un pH óptimo podría ser uno más bajo al del pI, adicionalmente, si la actividad se mantiene en el sobrenadante, además de aumentar la saturación con la sal, se puede hacer uso de cambios en pH para optimizar el aislamiento (Lovrien & Matulis, 2001; Wingfield, 2016), esto indica que si para las lectinas de *T. cylindrica* se determina su pI pueden realizarse dichas variaciones al método de fraccionamiento para que su aislamiento sea aún más efectivo .

Se reconoce en general que porcentajes de saturación altos son efectivos para precipitar proteínas de bajo peso molecular, y complejos multiproteicos grandes pueden precipitarse con porcentajes de saturación menores a 20% (Wingfield, 2001), esto está en concordancia con los valores altos (>50%) de saturación requeridos para la precipitación de las lectinas de *T. cylindrica* hallados, como se mencionó una característica de las lectinas de algas marinas es su bajo peso molecular, lo que explicaría la efectividad del porcentaje alto de saturación de 50-80% hallado. Se han reportado porcentajes similares para el aislamiento de lectinas en algas marinas, UFH de *Ulva fasciata* requiere porcentajes entre 60-90% (S. Kumar & Barros, 2020), 60% para BtL de *Bryothamnion triquetrum* (Calvete et al., 2000; Fontenelle et al., 2018) y la lectina de *Vidalia obtusiloba* (Melo et al., 2004), 70% para GOL de *Gracilaria ornata* (Leite et al., 2005), 75% para TCL de *Tichocarpus crinitus* (Molchanova et al., 2010), entre otras, todas requieren porcentajes superiores al 50%.

Los extractos obtenidos de la precipitación con sulfato de amonio, dializados y liofilizados presentaron una coloración rosa, amarilla y café, para las fracciones 0-50%, 50-70% y sobrenadante, respectivamente (**Figura 2- 9**). Dichas coloraciones se relacionan con la cantidad de pigmentos que precipitan donde probablemente hay una mayor concentración de ficobiliproteínas a mayor porcentaje de saturación. Se ha reportado en cianobacterias y algas rojas, que estos pigmentos precipitan usualmente en porcentajes de saturación entre 40-70%, para las presentes en *Hypnea japonica*, por ejemplo, se requiere un porcentaje aún mayor de 85% para extraerlos (R. Pinto et al., 2018; L. Sun et al., 2009). Lo anterior explicaría la coloración en el sobrenadante y cómo se observa en la **Figura 2- 9** hay una coloración más fuerte en la fracción 50-80% (**Figura 2- 9, E**) respecto a la de 0-50% (**Figura 2- 9 A**), por lo que tanto, en este paso además de concentrar la proteína se elimina una proporción de los pigmentos asociados en las fracciones no activas, aunque algunos de los pigmentos siguen presentes al formar complejos con algunas proteínas (Osório et al., 2020).

Figura 2- 9: Extractos obtenidos con sulfato de amonio como agente precipitante.

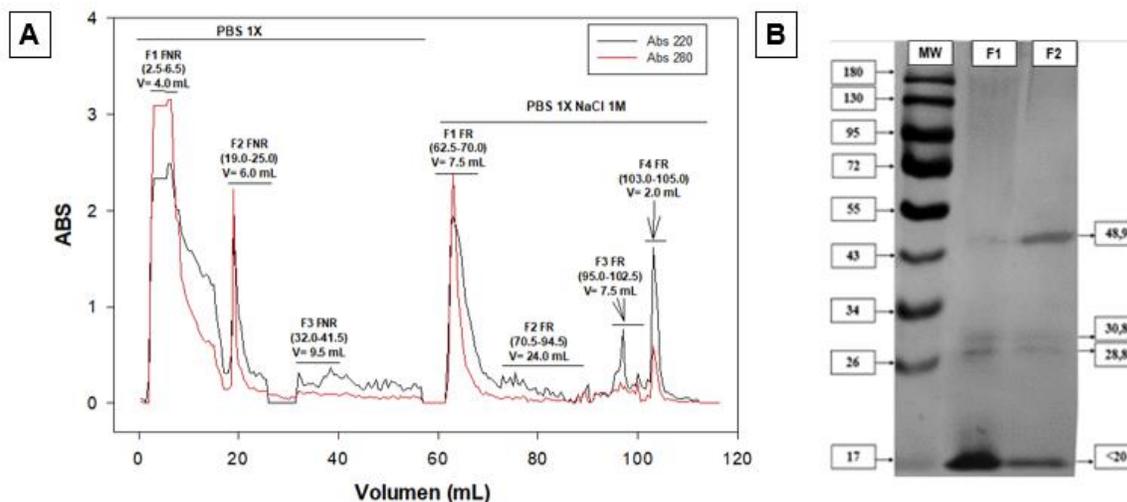


A. ETc1-DL0-50%*s.* **B.** ETc1-DL50-70%*s.* **C.** ETc1-DL Sobrenadante. **D.** ETc2UD Sobrenadante. **E.** ETc2-UD 50-80%*s.* **F.** ETc2-UD 0-50%*s.*

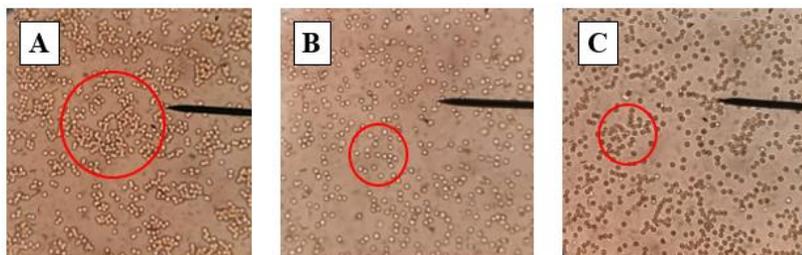
2.2.5 Cromatografía de Intercambio Iónico

Inicialmente 9.8 mg del de extracto activo (ETc2-UD) se sembraron en una columna de DEAE-Sephadex A-50; la fracción no retenida (FNR) eluyó en tres fracciones bien diferenciadas (**Figura 2- 10 A**), así, F1 FNR, en la que se detectó actividad de aglutinación (+4) (99 μ g), mientras que las otras dos fracciones, F2 FNR (31 μ g) y F3 FNR, no mostraron actividad. La mayor absorbancia a 280 nm que se observa en los perfiles se debe a que en estas fracciones eluyeron algunos pigmentos.

Al aumentar la fuerza iónica se obtuvieron cuatro (4) fracciones retenidas (FR), donde no se detectó actividad, aunque en la fracción cuatro (F4) se detectó una aglutinación (\pm) muy débil (25 μ g) (**Figura 2- 11 C**). Por lo tanto, con la fracción no retenida se llevaron a cabo los subsecuentes pasos de purificación. Por SDS PAGE se observó un perfil similar para las fracciones FNR, F1 y F2, 4 bandas alrededor de 48, 30, 29 y 15 kDa. Sin embargo, en la F1 FNR se observó una mayor intensidad de la banda de 15 kDa y ausencia de la banda de 48 kDa (**Figura 2- 10 B**). Los resultados obtenidos en esta etapa de purificación muestran que la lectina podría tener pesos moleculares entre los 20-50 kDa en condiciones denaturantes.

Figura 2- 10: Cromatografía de intercambio iónico -DEAE Sephadex A-50 ETc2-UD.

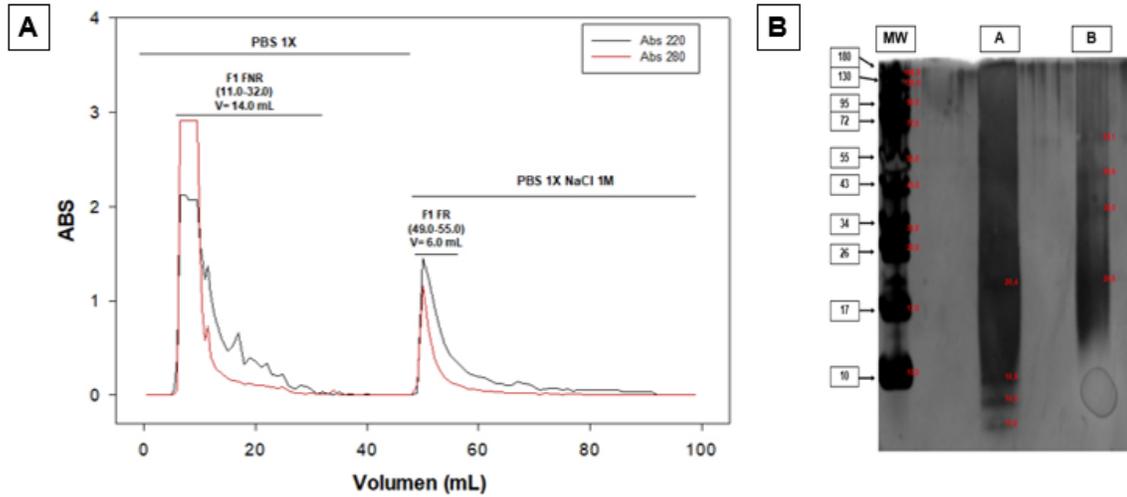
A: Perfil cromatográfico, se observan 3 fracciones no retenidas (F1 FNR, F2 FNR, F3 FNR) y cuatro retenidas eluidas (F1 FR, F2 FR, F3 FR, F4 FR) eluidas con PBS 1X NaCl 1M. **B:** SDS PAGE 12% Tris-glicina, muestras con +Δ -DTT. F1: F1 FNR (19,8µg) y F2: F2 FNR (6,2µg). MW: marcador de peso molecular.

Figura 2- 11: Ensayos de aglutinación con eritrocitos B al 2% -Cromatografía de intercambio iónico muestra ETc2-UD.

A. F1 FNR: Aglutinación (+3) (99µg). **B.** F2 FNR: actividad (-) (31µg). **C.** F1 FR: actividad (±) (25µg). Círculo rojo: grupos de eritrocitos aglutinados µg: cantidad total de proteína usada en el ensayo.

Se llevaron a cabo otras purificaciones con la fracción 50-80%_s ETc3-DL; 14.69 mg de proteína total se colocaron en la columna y se obtuvieron dos fracciones diferenciadas, no retenida, F1 FNR, con actividad (+) y una retenida, F1 FR, desprovista de actividad. Por SDS-PAGE no se observó un perfil claro de bandas para ninguna de las fracciones, aunque en la F1 FNR se observaron bandas <10kDa respecto a F1 FR (**Figura 2- 12 B**). El background puede deberse a la presencia de sales, carbohidratos o polisacáridos que no fueron eliminadas durante los procesos de diálisis.

Figura 2- 12: Cromatografía de intercambio iónico -DEAE Sephadex A-50 para la F50-80%_s ETC3-DL.



A: Perfil cromatográfico, se observan dos fracciones bien diferenciadas, F1 FNR (Fracción no retenida) y F1 FR (fracción retenida). **B:** SDS-PAGE -tricina 10%. Muestras +Δ -DTT A. F1 FNR. B. F1 FR. MW: marcador de peso molecular. 50µg proteína total /carril.

Se evidenció que la actividad solo se presentó en la fracción no retenida F1 FNR, con títulos entre 6.2-5.4 µg, adicionalmente, se recuperó una cantidad de proteína mayor cuando se sometió a purificación el precipitado 50-80%_s (12.04 mg) con respecto el extracto concentrado (9.80 mg) (**Tabla 2- 7**).

Tabla 2- 7: Fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico -DEAE Sephadex A-50 sobre extracto ETC2-UD y F 50-80%_s ETC3-DL.

| Fracción | Volumen (ml) | Concentración (mg/ml) | mg totales | Actividad (Eritrocitos O) | Título (µg) [#] |
|--|--------------|-----------------------|------------|---------------------------|--------------------------|
| ETC2-UD | 6.0 | 1.63 | 9.80 | +4 | 20.4 |
| F1 FNR | 4.0 | 0.99 | 3.84 | +3 | 6,18 |
| F2 FNR | 6.0 | 0.31 | 0.60 | - | - |
| F3 FNR | 9.5 | 0 | 0 | - | - |
| F1 FR | 7.5 | 0.25 | 1.88 | - | - |
| F2 FR | 24 | 0.99 | 3.84 | +3 | 6,18 |
| F50-80%_s ETC3-DL | 6.5 | 2.26 | 14.69 | +4 | 14.13 |
| F1 FNR | 14 | 0.86 | 12.04 | +3 | 5.37 |
| F1 FR | 6 | 0.23 | 1.38 | - | - |

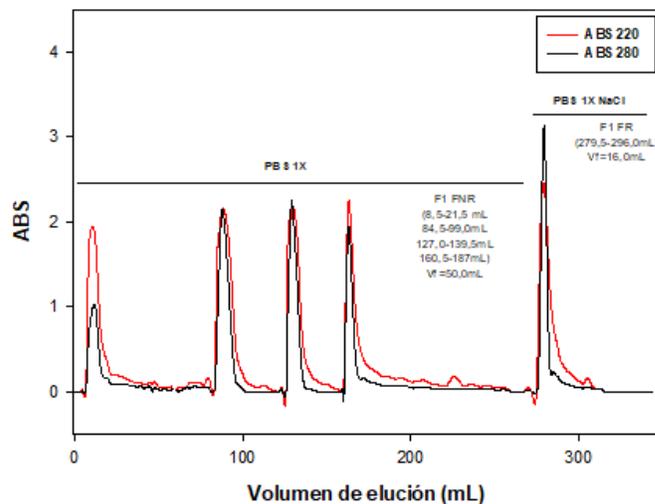
Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación]. # Cantidad mínima de proteína para observar aglutinación.

Estos resultados (**Tabla 2- 7**) indican como el aislamiento con sulfato de amonio además de concentrar la proteína y eliminar algunos interferentes, también es eficaz en pasos posteriores de purificación al asegurar una recuperación mayor de la lectina. Para el

aislamiento de otras lectinas de algas marinas es un paso previo al uso de otros métodos de purificación (Chaves et al., 2018b; Sampaio et al., 2002).

Por otra parte, los extractos tuvieron una alta viscosidad y por lo tanto interfirieron durante la cromatografía de intercambio iónico, de tal forma que impidieron que se diera un proceso continuo, por ello se adicionó a la columna la fracción 50-80% sin concentrar de manera secuencial, se sembraron 17.0 ml de F 50-80% en tres adiciones como se observó en el perfil, lo que permitió realizar la elución de la fracción no retenida y se evitó la disminución del flujo de la columna. Así mismo, la fracción no retenida se obtuvo en una sola fracción bien diferenciada (**Figura 2- 13**). Esta metodología nos permitió, además de aislar la fracción activa de interés, disminuir tiempos de elución y obtener una mayor cantidad de la fracción no retenida con actividad para continuar las ulteriores etapas de purificación.

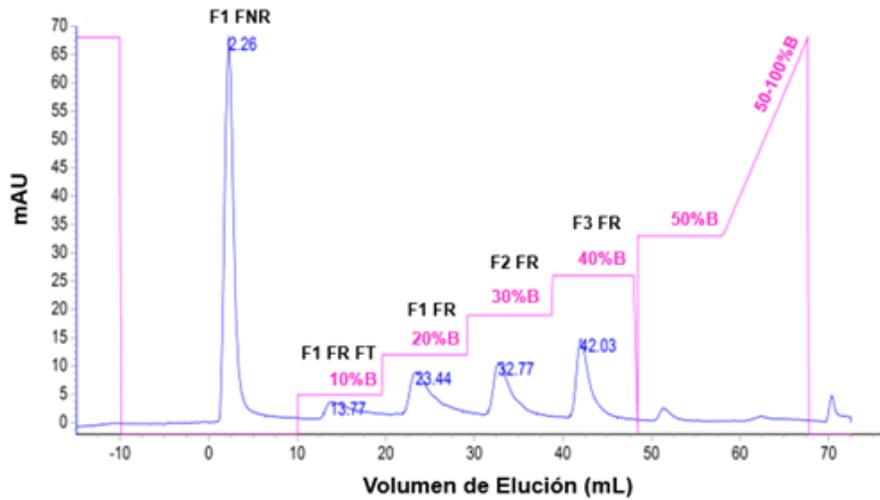
Figura 2- 13: Perfil cromatografía de intercambio iónico DEAE-Sepharosa secuencial.



Se sembraron 17 ml con una concentración de 1,51 mg/ml de F 50-80% activa (+4), se observan tres fracciones no retenidas y una fracción retenida y eluida a alta fuerza iónica.

Otros métodos de purificación se llevaron a cabo por cromatografía de intercambio iónico usando FPLC y diferentes gradientes de fuerza iónica. En la **Figura 2- 14** se muestra una fracción no retenida de mayor absorbancia, sin embargo, al inicio de la adición de sales PBS 1X NaCl 10 (%B) la señal es muy baja (F1 FR FT), posteriormente hacia el 20%, 30% y 40% de B se evidencian fracciones diferenciadas. Al igual que los ensayos de actividad obtenidos previamente, solo se encontró actividad en la fracción no retenida (**Tabla 2- 8**).

Figura 2- 14: Cromatografía de Intercambio aniónico Hitrap Q HP para fracción activa F1 FNR proveniente de cromatografía de intercambio iónico DEAE Sephadex A-50.



Se sembraron 0.5 ml de fracción activa F1 FNR de DEAE-Sephadex A-50 de concentración 0,86 mg/ml que correspondieron a 430 µg.

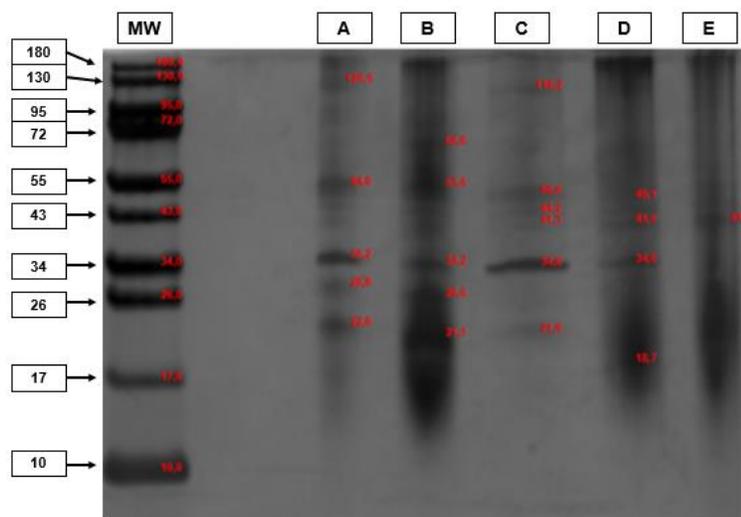
En la **Tabla 2- 8** se reportan las fracciones aisladas usando FPLC, estas corresponden a un pool de 11 corridas realizadas, que permitieron alcanzar 6.8 mg totales con actividad.

Tabla 2- 8: Fracciones FPLC muestra F1 FNR DEAE-Sepharosa.

| Fracción* | Actividad** | (mg/ml) | Cantidad proteína (mg) | Título (µg) # |
|-----------|-------------|---------|------------------------|---------------|
| F1 FNR | ++ | 0.800 | 6.80 | 10 |
| F1 FR | - | 0.214 | 0.92 | - |
| F2 FR | - | 0.254 | 1.02 | - |
| F3 FR | - | 0.294 | 1.32 | - |

*: Las fracciones fueron dializadas previamente ** Suspensión de eritrocitos O al 2 %. #Cantidad mínima de proteína en µg requerida para observar aglutinación.

Por SDS-PAGE se evidenciaron varias bandas en todas las fracciones, para la fracción activa F1 FNR se observan bandas entre los 23 a 103 kDa, para las fracciones eluidas a porcentajes altos de cloruro de sodio (NaCl) se presenta un background que no permite observar las bandas (**Figura 2- 15**), aunque las muestras se dializaron previamente. Estos resultados indican que el uso de FPLC es, un método efectivo para obtener una fracción activa aislada.

Figura 2- 15: SDS PAGE- tricina +10% fracciones de FPLC.

SDSPAGE -Tricina 10% + Δ -DTT. A) F1 FNR, B) F1 FR FT*, C) F1 FR, D) F2 FR, E) F3 FR. MW: marcador de peso molecular, 2 μ g de proteína total /Carril. *: Esta fracción solo se recolecto en 2 de las 11 corridas realizadas.

La cromatografía de intercambio iónico es un método ampliamente utilizado en el aislamiento de lectinas de algas marinas en las primeras etapas de purificación, intercambiadores aniónicos débiles que tienen DEAE (Dietilaminoetil) han sido empleados en el aislamiento de lectinas tales como, *Gracilaria ornata* (GOL) , *Hypnea musciformis* (HML) (Leite et al., 2005), *Vidalia obtusiloba*, *Solieria filiformis* (SfL) (Barros et al., 1996; Chaves et al., 2018a; Melo et al., 2004). Lectinas del género *Bryothamnion* como BTL de *B. triquetrum* y BSL de *B. seaforthii* también se aíslan usando DEAE-celulosa (V. Pinto et al., 2009); otras como CiL-1 y CiL-2 de *Codium isthmocladum* y *Hypnea cervicornis* (HCA) (K. Nascimento et al., 2006).

Con esta técnica además del aislamiento de las proteínas se pueden eliminar pigmentos interferentes, no obstante los extractos de algas rojas que tienen pigmentos proteicos como las ficobilinas, no son eliminados en su totalidad ni durante el proceso de extracción, precipitación e intercambio iónico (Teixeira et al., 2012); aunque los resultados de actividad aglutinante indican que es un método de purificación que permite obtener la(s) lectina (s) de *T. cylindrica* en pasos intermedios de aislamiento.

3. Ensayos de Inhibición de Carbohidratos

3.1 Metodología

Se hicieron pruebas de inhibición con los monosacáridos D-glucosa (0.3 M), manosa (0.2 M), galactosa (0.2 M), N-acetil D-galactosamina (0.3M) y N-acetil- α -D-glucosamina (0.3M). Se mezclaron volúmenes de 50 μ l del extracto (F 50-80%_s de ETc1-UD) y 50 μ l de las soluciones de carbohidrato, las cuales se dejaron interactuar por 30 min. Luego se agregaron 50 μ l de la suspensión de eritrocitos B al 2%. Los controles de buffer, eritrocitos y azúcar se hicieron en las mismas condiciones. Los ensayos de inhibición con disacáridos y trisacáridos se hicieron con lactosa (0,2 M), Melibiosa, Melecitosa, Maltosa, Palatinosa, Celobiosa y Trehalosa en una concentración de 0.1 M; para ello 12,5 μ l de extracto obtenido por precipitación con sulfato de amonio 50-80%_s (a partir de ETc3-DL) y 12,5 μ l de carbohidrato se incubaron durante 40 minutos, posteriormente se adicionaron 12,5 μ l de suspensión de eritrocitos O al 2%. Los resultados se observaron de forma cualitativa y se corroboraron al microscopio con aumento 10x y 40x.

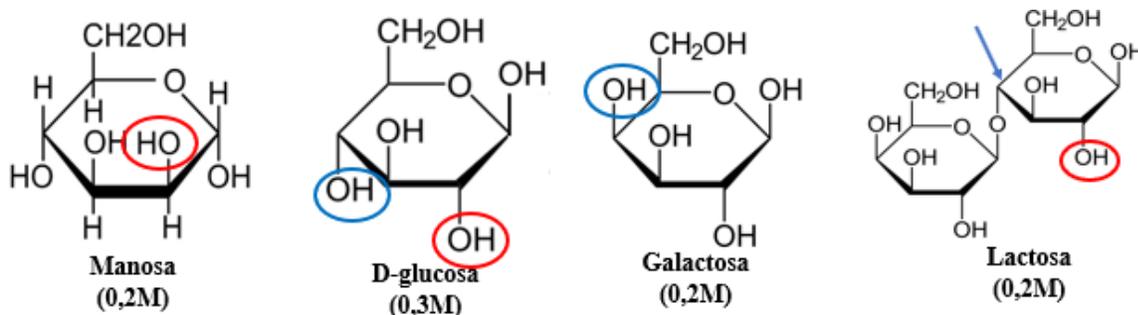
3.2 Resultados y Análisis

Se realizaron ensayos de inhibición de la actividad aglutinante con soluciones de monosacáridos, para determinar la especificidad de la (s) lectina(s). Teniendo como control de aglutinación, uno de los extractos activos (+3) (F 50-80%_s de ETc1-UD), se comparó la actividad aglutinante con el mismo extracto en presencia de los carbohidratos. La manosa fue el único monosacárido que no inhibió la actividad; con los demás monosacáridos evaluados, se presentó inhibición con diferente intensidad así, con galactosa (Gal) (+2) y D-glucosa (Glc) la inhibición fue total (-). Lo anterior indica que estas lectinas son específicas por residuos de glucosa y son capaces de discriminar epímeros como la

manosa (Man), por otra parte, se presentó una inhibición parcial con Lactosa (Lac) ($\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$) (+1) por lo que disminuye su reconocimiento cuando la Glc está formando este disacárido.

Los esfingolípidos de los eritrocitos tienen determinantes antigénicos B (**$\text{Gal}\alpha 1,3(\text{Fuc}\alpha 1,2)\text{Gal}\beta 1\text{-R}$**), con una unidad terminal de Gal (galactosa). Algunas lectinas como *P. plumosa* (PPL) aglutinan preferentemente eritrocitos tipo B y su actividad es inhibida por galactosa, glucosa y derivados con *p*-nitrofenil- α -D-galactósido (Sampaio et al., 2002). La actividad aglutinante del extracto (F 50-80% de ETc1-UD) fue inhibido en forma similar, $\text{Glc} > \text{Lac} > \text{Gal}$; no obstante, otras lectinas que aglutinan eritrocitos B son inhibidas solo por Gal (galactosa), sin embargo, la capacidad de inhibición de estos dos monosacáridos se da por su similaridad estructural al diferir solo en la orientación del hidroxilo en el C-4 del anillo de piranosa. Lo anterior indica que la lectina reconoce la orientación de este OH en cualquiera de las dos conformaciones (α, β). Además, discrimina los epímeros de manosa y glucosa, demostrando que es importante en la interacción el OH del C-2 del anillo de piranosa (**Figura 3- 1**), que se observa de nuevo en el reconocimiento por lactosa.

Figura 3- 1: Estructuras de los monosacáridos y el disacárido usados en los ensayos de inhibición preliminares.



Hidroxilos importantes en el reconocimiento específico en color rojo y en azul los que no son discriminados.

La mayoría de las lectinas aisladas de algas rojas tienen una mayor afinidad hacia estructuras complejas como glicoconjugados u oligosacáridos (Singh & Walia, 2018). Es importante resaltar que la especificidad hacia D-glucosa es menos común; se ha reportado en lectinas aisladas de *Hypnea cervicornis*, *H. musciformis* (Nagano et al., 2005b), *Enantiocladia duperreyi* (Benevides et al., 1998), *P. plumosa* (Sampaio et al., 2002), y *Griffithsia* sp. (Ziółkowska et al., 2007).

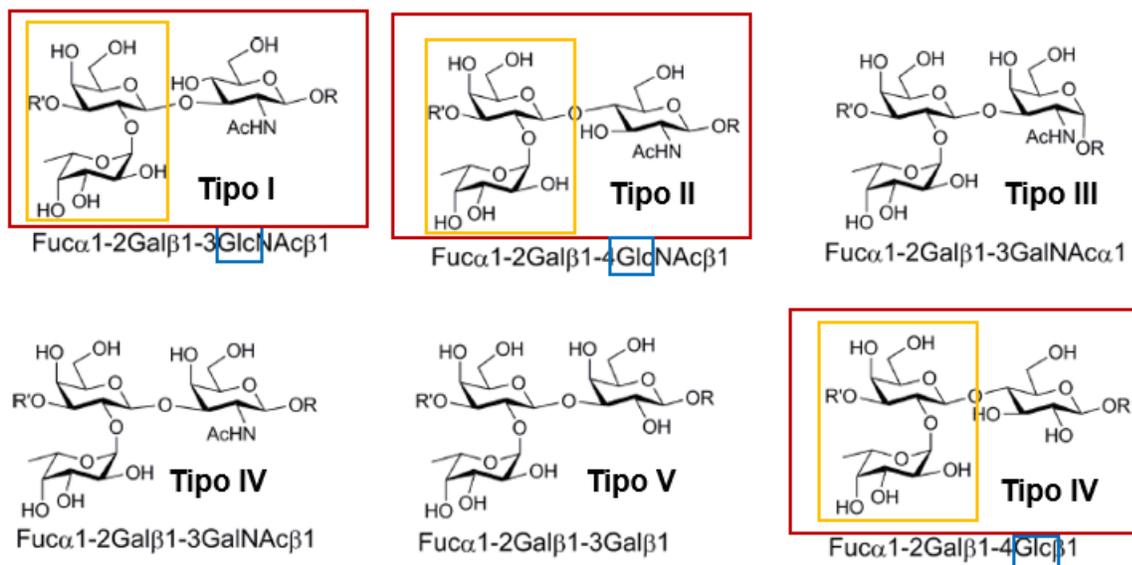
Para la lectina de *P. plumosa* (PPL) que es específica por el grupo sanguíneo B (denominándose anti-B) y por el monosacárido glucosa se reporta una especificidad adicional por los carbohidratos en configuración α (Sampaio et al., 2002), otras lectinas aisladas del género *Ptilota*, al igual que las lectinas de la familia Fabácea, tienen una región hidrófoba adyacente al sitio de unión a carbohidratos que potencia el reconocimiento por grupos hidrofóbicos, que se encuentran en glicanos, debido a que PPL posee características similares de especificidad a las aisladas de *T. cylindrica* se podrían presentar características moleculares y de reconocimiento similares.

En la naturaleza los antígenos ABH se dividen en subtipos, dependiendo de la cadena de sacáridos externa, resultando en 12 tetrasacáridos diferentes, tipos I-VI. Las cadenas tipo I presentan la secuencia Gal β 1-3GlcNAc β 1, tipo II en Gal β 1-4GlcNAc β 1, tipo III en Gal β 1-3GalNAc α 1, tipo IV Gal β 1-3GalNAc β 1, tipo V Gal β 1-3Gal β 1 y tipo VI en Gal β 1-4Glc β 1 (**Figura 3- 2**). Se han detectado anticuerpos específicos para los glicanos de los grupos sanguíneos A y B en el suero humano, lo que indica que la estructura de la cadena puede influir en la capacidad de capturar algunos anticuerpos contra los glicotopes de los grupos sanguíneos (Hara et al., 2014; Muthana et al., 2015).

Adicionalmente, los determinantes antigénicos ABH varían en localización, tipo y superficie celular, como en su densidad; esto es relacionado con su funcionalidad, dicha especificidad de los determinantes antigénicos debida a las cadenas de sacáridos externas es importante para dilucidar no solo la funcionalidad en el organismo, sino para las aplicaciones potenciales. Por ejemplo, la determinación del subtipo específico del grupo sanguíneo disminuye el riesgo en trasplantes de órganos; pues se ha determinado como al anticiparse la distribución de los subtipos de antígenos A/B en células de órganos particulares, se determinaría a su vez la sensibilidad de las mismas al ataque de anticuerpos y al rechazo del trasplante o su aceptación por el hospedero (Hara et al., 2014; Muthana et al., 2015).

Teniendo en cuenta dichos subtipos, y la especificidad por lactosa, la lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC) podría reconocer los subtipos I, II y VI, adicionalmente se podría potenciar el reconocimiento por la fucosa α 1-2Galactosa (**Figura 3- 2**).

Figura 3- 2: Tipos de determinantes antigénicos de los grupos sanguíneos A y B, tipos I-VI.



R = glicoproteína o glicolípido

R' = H en antígenos H, GalNAc en antígenos A, o, Gal en antígenos B

Fuente: Muthana et al., 2015. se señalan en color azul los residuos de Glc al interior del determinante antigénico. Color amarillo el disacárido fucosaa1-2Galactosa, los tipos I, II y VI presentan el disacárido lactosa en su estructura.

Los azúcares N-acetil D-galactosamina (0.3M) y N-acetil- α -D-glucosamina (0.3M), no inhibieron la actividad aglutinante, revelando que esta lectina podría discriminar entre los subtipos I, II y VI; siendo más específica por el subtipo VI ya que el grupo acetil no es importante en la interacción.

La importancia de esta discriminación puede estar asociada a funciones fisiológicas específicas en el organismo y se considera posee significancia clínica, se reconoce que ciertos tejidos presentan una mayor cantidad de un tipo de antígeno sobre otro, por ejemplo los tejidos epiteliales poseen mayor cantidad de determinantes tipo II, las células del páncreas y el riñón son ricas en el tipo IV, esto es relevante en la identificación de la compatibilidad para la realización de trasplantes de órganos como se mencionó anteriormente (Clausen & Hakomori, 1989; Lindberg et al., 2011, 2012; Ravn & Dabelsteen, 2000).

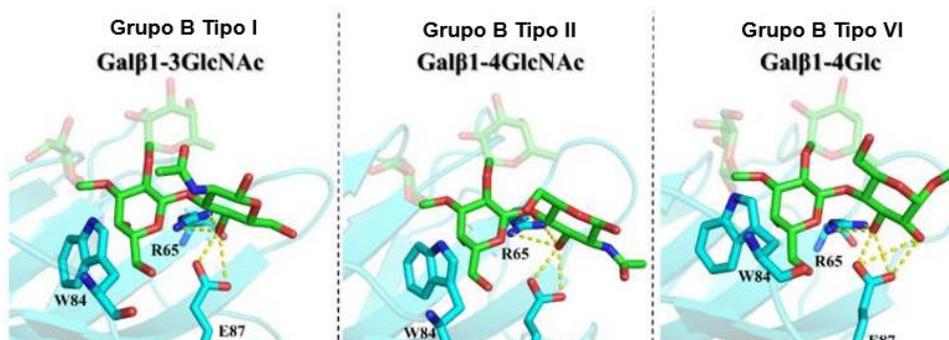
Se ha reportado que el suero de los donantes tienen anticuerpos específicos para los determinantes A y B; identificar las densidades específicas y el tipo de grupo sanguíneo es importante para asegurar que no se presenten rechazos durante y después de los trasplantes, lo que implica una disminución de costos al tener una aproximación sencilla como lo es la identificación de estos tipos mediante microarreglos de glicanos, adicionalmente, se aseguraría que el órgano sea trasplantado con mejores expectativas de vida. Además, se pueden emplear lectinas con especificidad definida en pruebas de alto rendimiento (High-throughput screening) (Lindberg et al., 2011; Muthana et al., 2015).

La Galectina-4 de humano, presenta especificidad por los determinantes antigénicos B tipo VI, por docking molecular se estableció que para los tipos II y VI (epítotos con unión β 1-4) el extremo reductor del anillo de piranosa en las posiciones 2 y 3 están frente a la lectina, para el análogo tipo I (epítoto con unión β 1-3) esas posiciones son contrarias estando expuestas al solvente, para los tipos II y VI se predijeron puentes de hidrógeno entre en OH de C3 del extremo reductor del azúcar (Glc-GlcNAc) con las cadenas de los residuos R65 y E87, para el tipo VI se presentó un enlace adicional entre el OH del C2 de la Glc con el grupo carboxilo del residuo E87, la presencia de esa interacción adicional podría explicar la mayor afinidad que se presenta en la Galectina-4 por el tipo VI respecto al II (Constantes de afinidad: K_D 88 μ M tipo II y K_D 51 μ M para el tipo VI) (Quintana et al., 2021) (**Figura 3-3**).

En las secuencias de lectinas de algas marinas estos dos aminoácidos se presentan como abundantes, y podrían tal como en la Galectina-4 estar implicados en este reconocimiento, esta hipótesis para las lectinas en estudio podría soportarse en la especificidad por glucosa hallada además de que se comparte la importancia del hidroxilo en el C2 para el reconocimiento. Se realizó un alineamiento múltiple entre el N-terminal de la Galectina-4 (aminoácidos 1-150) y las secuencias de las lectinas de algas rojas curadas reportadas en Uniprot, con ClustalW (matriz BLOUSM62) y COBALT de NCBI (matriz BLOSUM80). En el alineamiento con ClustalW se presentaron dos glicinas conservadas para todas las secuencias en posición 110 y 135 en el alineamiento correspondientes a G57 y G81 en la Galectina-4 (**Anexo C, Figura C- 1**), en COBALT solo se registró una prolina conservada en posición 15 (P15) para la Galectina-4 que en el alineamiento general corresponde a la posición 83 para todas las secuencias (**Anexo B, Figura C- 2, Figura C- 3**). Dichos aminoácidos no están involucrados en la interacción de la Galectina-4 con el determinante

antigénico B subtipo VI cómo se evidencia en la **Figura 3- 3**, pero hay variabilidad en las secuencias de aminoácidos entre algas, por lo que residuos similares presentes en la estructura de las lectinas de *T. cylindrica* podrían estar implicados en el reconocimiento del subtipo VI.

Figura 3- 3: Docking Galectina-4 de humano con los tipos I, II y VI, del determinante antigénico B



Modelos moleculares de los complejos entre Galectina- 4 de humano con los tipos I, II y VI, del determinante antigénico B simulados con dinámica molecular. Fuente: (Quintana et al., 2021).

Con respecto a los disacáridos evaluados, no se presentó inhibición alguna con palatinosa ni maltosa, mientras que para la melecitosa y la celobiosa hubo una inhibición parcial, en cambio, se presentó inhibición total con la melibiosa y la Trehalosa (**Tabla 3- 1**).

Tabla 3- 1: Inhibición de Disacáridos y Trisacáridos

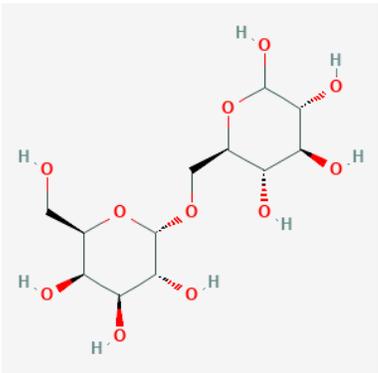
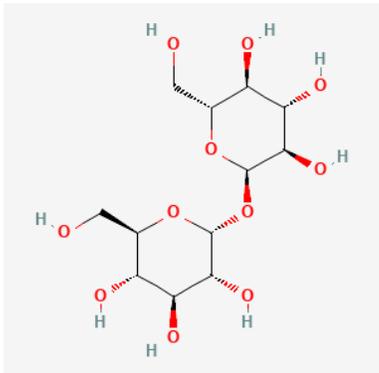
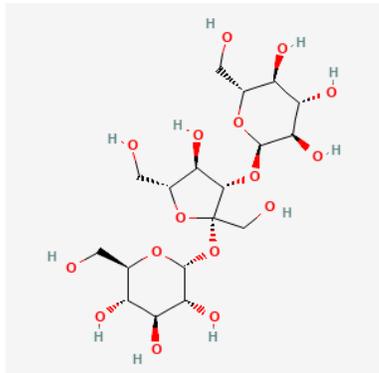
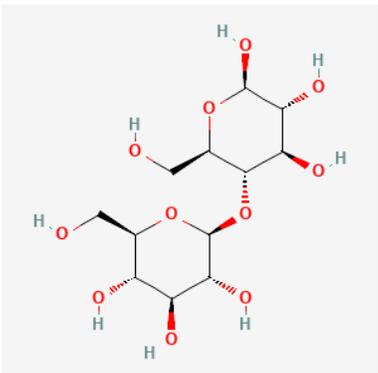
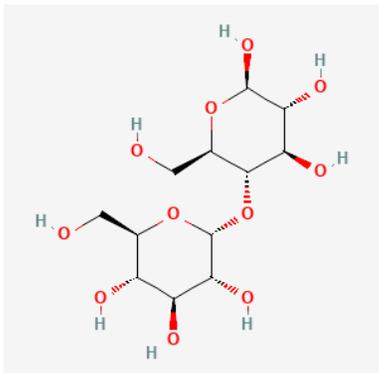
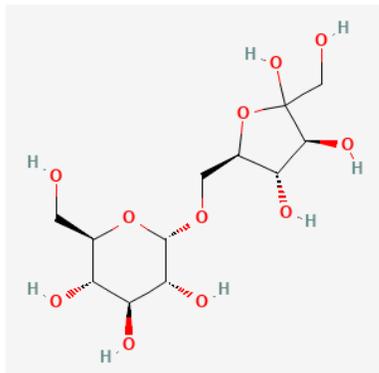
| Carbohidrato | Actividad Aglutinante ¹ | Inhibición |
|-------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| Control positivo | ++ | NA |
| Melibiosa | ± | Inhibición total |
| Maltosa | ++ | No inhibe |
| Melecitosa | + | Inhibición parcial en +1 |
| Trehalosa | - | Inhibición total |
| Palatinosa | ++ | No inhibe |
| Celobiosa | + | Inhibición parcial en +1 |

¹Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación].

La Trehalosa (D-Glc α (1,1)-D-Glc) es un disacárido no reductor y la melibiosa (D-Gal α (1,6)-D-Glc) es un disacárido reductor, lo que indica que reconoce el enlace glicosídico en configuración α y β (**Tabla 3- 2**) (Heljo et al., 2013). Comparando la estructura de los disacáridos Celobiosa (D-Glc β (1,4)-D-Glc) y Maltosa (D-Glc α (1,4)-D-Glc) (**Tabla 3- 2**), se evidencia que el OH en el C4 de la segunda glucosa es importante en el reconocimiento. Por otra parte, en cuanto a la Melecitosa (Glc α (1 \rightarrow 2)fruc α (1 \rightarrow 3) Glc) y la Palatinosa (Glc

$\alpha(1\rightarrow6)$ fruc), no inhiben la actividad, las dos presentan una fructosa en su estructura que podría explicar la falta de reconocimiento a pesar de presentar un residuo de glucosa en su estructura.

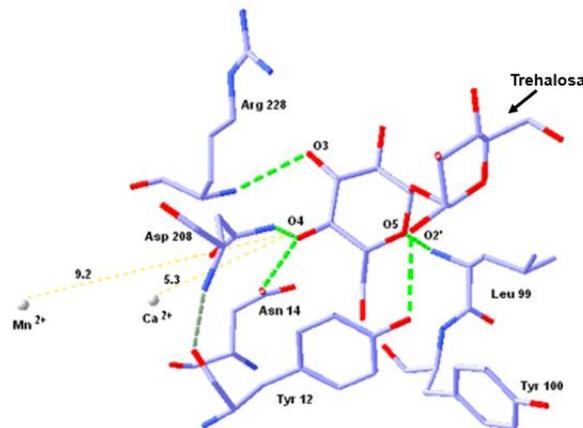
Tabla 3- 2: Estructuras de los disacáridos y el trisacárido ensayados

| | | |
|---|---|---|
|  <p>Diagram showing a yellow circle (Gal) and a blue circle (Glc) connected by a bond labeled α 6.</p> |  <p>Diagram showing two blue circles (Glc) connected by a bond labeled α α.</p> |  <p>Diagram showing a blue circle (Glc) connected to a green pentagon (Fruf) labeled 'f' via a bond labeled α 3, which is then connected to another blue circle (Glc) via a bond labeled β α.</p> |
| <p>Melibiosia α-D-galacto-hexopiranosil-(1->6)-D-glucopiranososa</p> | <p>Trehalosa α-D-glucopiranosil α-D-glucopiranosido</p> | <p>Melecitosa α-D-glucopiranosil α-D-glucopiranosil-(1->3)-β-D-arabino-hex-2-ulofuranosido</p> |
|  <p>Diagram showing two blue circles (Glc) connected by a bond labeled β 4.</p> |  <p>Diagram showing a blue circle (Glc) connected to another blue circle (Glc) via a bond labeled α 4 β.</p> |  <p>Diagram showing a blue circle (Glc) connected to a green pentagon (Fruf) labeled 'f' via a bond labeled α 6, which is then connected to another blue circle (Glc) via a bond labeled β.</p> |
| <p>Celobiosia β-D-glucopiranosil-(1->4)-β-D-glucopiranososa</p> | <p>Maltosa α-D-glucopiranosil-(1->4)-β-D-glucopiranososa</p> | <p>Palatinosa α-D-glucopiranosil-(1->6)-D-arabino-hex-2-ulofuranosida</p> |

Fuente: National Center for Biotechnology Information (2021).

La especificidad por Trehalosa no se ha reportado para las lectinas aisladas de algas, pero si para las de otros recursos marinos como la lectina del cangrejo *Atergatis integerrimus* (AiL) (Elayabharathi et al., 2020), y dos lectinas del bivalvo *Pteria penguin* (PPL2A y PPL2B) (Naganuma et al., 2014). También se reportó una lectina de plantas, ConM de *Canavalia maritima* donde los hidroxilos C3, C4 y C5 de la primera glucosa y el del C2 de la segunda glucosa participan en el reconocimiento (Delatorre et al., 2006) (**Figura 3- 4**).

Figura 3- 4: Trehalosa en el sitio de reconocimiento de carbohidratos (CDR) de la lectina ConM de *Canavalia maritima*.



Se forman 5 puentes de hidrógeno con Arg 228, Asp 208, Asn 14, Tyr 12 y Leu 99.
Fuente: (Delatorre et al., 2006).

El mejor monosacárido que inhibió la actividad aglutinante fue la glucosa inclusive a una concentración de 25mM, de manera que en el reconocimiento de la LTC son importantes los OH en el C-4 y C-2, y no se discrimina la configuración α o β del enlace glicosídico.

4. Purificación de la lectina de *T. cylindrica* (LTC)

4.1 Cromatografía de afinidad

4.1.1 Metodología

Teniendo en cuenta los resultados de inhibición con carbohidratos se llevaron a cabo ensayos empleando soportes con Glucosa, Trehalosa e Invertasa acoplados a la Sepharosa 4B. Los soportes de Glucosa y Trehalosa se acoplaron por medio de activación con divinilsulfona (DVS sigma), siguiendo la metodología descrita por Hermanson et al., 1992. La Invertasa se acoplo con Sepharosa 4B activándola con Bromuro de cianógeno (CNBr) (CNBr-activated Sepharose™ 4B- GE Healthcare); el acople se realizó en buffer bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0.1 M pH 8.3 conteniendo NaCl 0.5 M (**Anexo D**). Posteriormente se evaluó su funcionalidad con la lectina tipo I de *Dioclea grandiflora* (**Anexo E, Figura E- 1**). La elución de la fracción no retenida se hizo con PBS 1X; mientras que las fracciones retenidas con Glucosa 0.2 M y dos soluciones buffer, Glicina (50mM) HCl pH 3.0 y Tris (50 mM, NaCl 150mM) HCl pH 8.3.

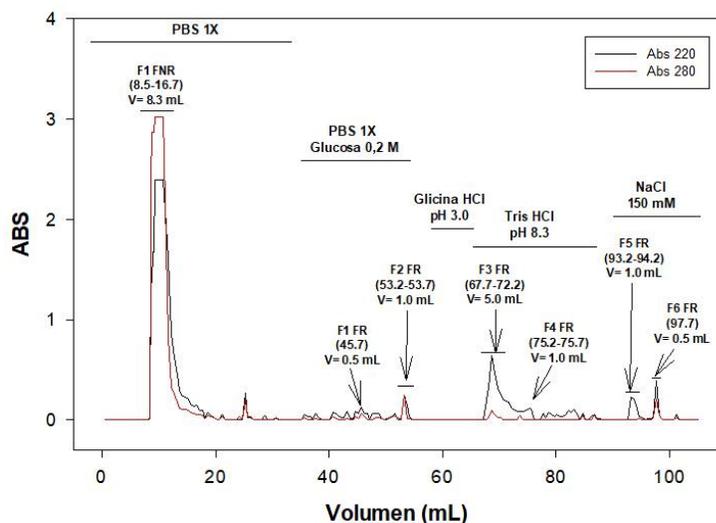
El soporte de Concanavalina A (ConA) fue adquirido comercialmente (Con A Sepharose™ 4B, GE Healthcare), para su uso se requiere de iones divalentes por lo que la fracción no retenida fue eluida con NaCl 1% conteniendo iones manganeso (Mn⁺⁺) y calcio (Ca⁺⁺) 5mM, la fracción retenida se eluyó con Glucosa 0.2 M y buffers, Glicina (50mM) HCl pH 3.0 y Tris (50 mM, NaCl 150mM) HCl pH 8.3.

Las cromatografías de afinidad se llevaron a cabo con las fracciones del 50-80%, intercambio iónico (F1 FNR) en columna abierta (Trehalosa, Invertasa, ConA) o FPLC (Invertasa, ConA).

4.1.2 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glucosa

Los resultados de inhibición mostraron que el mejor monosacárido inhibidor era la glucosa, por tanto, se comenzó usando este soporte y la fracción del 50-80% de ETc2-UD. Se obtuvieron 7 fracciones, una retenida (F1 FNR) y seis (6) retenidas (FR) (**Figura 4- 1**); solo en las fracciones retenidas se presentó actividad aglutinante, lo que está en concordancia con la especificidad por este carbohidrato; no se detectó actividad en la fracción no retenida. Los resultados muestran que toda la lectina se retuvo, aunque respecto a la proteína sembrada esta se encuentra en baja proporción (**Tabla 4- 1**). Con la adición de NaCl 150 mM al final de la elución se consiguió recuperar una mayor cantidad de proteína retenida.

Figura 4- 1: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Glucosa F 50-80% de ETc2-UD.



Se sembraron 4 mL de F 50-80% de ETc2-UD con una concentración 0.65 mg/ml que equivalen a 2.6 mg de proteína total, actividad: +4 por eritrocitos: B. Volumen de la columna 2 ml, flujo 0.5 ml/ min. Se observa una fracción no retenida (F1 FNR) y seis retenidas F1 FR y F2 FR eluidas con PBS 1X glucosa, F3 FR y F4 FR con Tris-HCl pH 8.3, F5 FR y F6 FR con NaCl 150 mM.

Se aislaron 0.78 mg de lectina repartidos en varias fracciones retenidas indicando que probablemente se presentan diferencias en la afinidad y que se evidencian en los títulos de aglutinación con eritrocitos O, para las fracciones, FR F1, FR F2 y FR F5 con 4.2, 5.5 y 1.9 μ g totales de lectina (**Tabla 4- 1**), lo que corresponde a lo observado por SDS PAGE, una banda única alrededor 29 kDa (**Figura 4- 2**). Para la fracción no retenida, no se

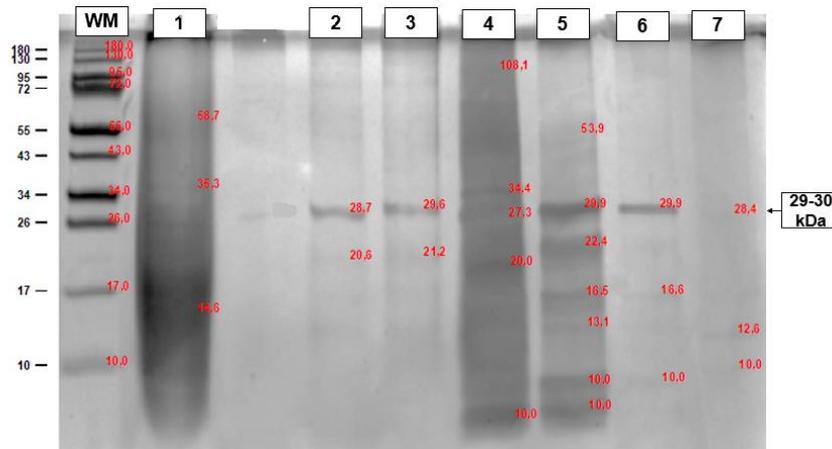
observó un patrón de bandas definido, probablemente por componentes que están interfiriendo en la resolución. En las fracciones retenidas F3 FR y F4 FR y eluidas con Tris HCl pH 8.3, hay un gran número de bandas de proteínas que interactúan de forma inespecífica con el soporte de afinidad.

Tabla 4- 1:Fracciones obtenidas cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glucosa

| Fracción* | mg/ml | mg totales | Actividad** | Título# |
|-----------|-------|---------------|-------------|---------|
| F1 FNR | 0.12 | 1.00 | - | - |
| F1 FR | 0.34 | 0.17 | + | 4.25 |
| F2 FR | 0.89 | 0.89 | + | 5.56 |
| F3 FR | 0.02 | 0.10 | - | - |
| F4 FR | 0.13 | 0.13 | + | 6.50 |
| F5 FR | 0.15 | 0.15 | + | 1.90 |
| F6 FR | 0.23 | 0.23 | + | 12.0 |

*: Las fracciones fueron dializadas previa determinación de la concentración. **: con una suspensión de eritrocitos O. #: Cantidad mínima de proteína (µg) requerida para observar aglutinación.

Figura 4- 2: SDS PAGE 12% Tris-glicina +Δ -DTT Fracciones de cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glucosa.



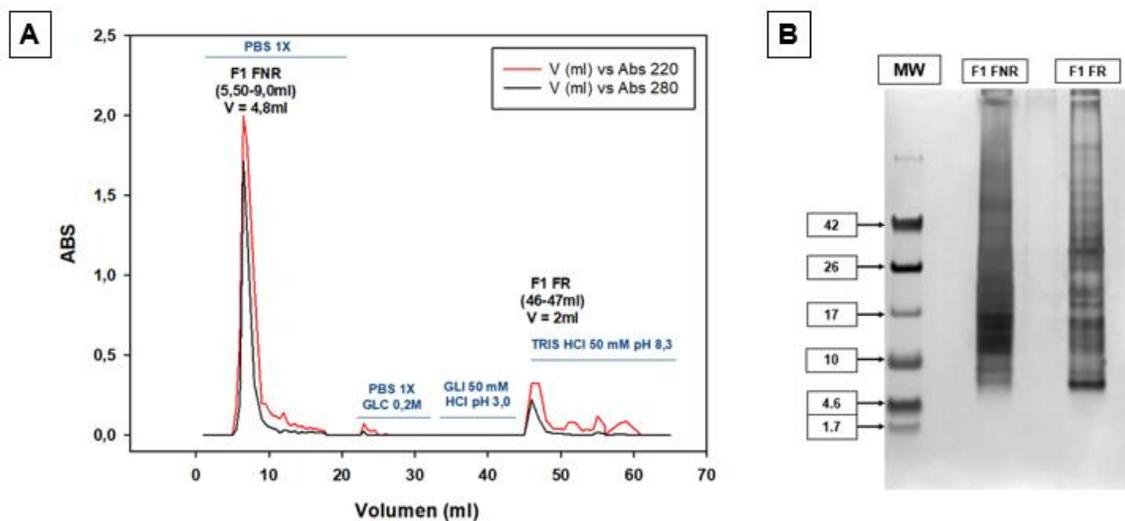
MW: marcador de peso molecular, Líneas: 1) F1 FNR, 2) F1 FR, 3) F2 FR, 4) F3 FR, 5) F4 FR, 6) F5 FR, 7) F6 FR. 50µg proteína/carril.

4.1.3 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa

Se sembró una muestra activa (+3) obtenida por FPLC (F1 FNR, 0.54 mg/ml, 1.12 mg totales) en la columna de Sepharosa 4B-Trehalosa, la fracción retenida se obtuvo únicamente con Tris (50 mM)-HCl pH 8.3 (**Figura 4- 3**), aunque la actividad de aglutinación se encontró en las dos fracciones obtenidas, no retenida (FNR) y retenida (F1 FR), lo que sugiere que no se retiene completamente (**Tabla 4- 2**). En el perfil electroforético se

observaron numerosas bandas para las dos fracciones, pero no se observó la banda de 29 kDa en la fracción retenida (FR) que correspondería con la lectina de acuerdo con los resultados previos (**Figura 4- 3**); aunque las fracciones se dializaron previamente, en la fracción no retenida puede estar presentes compuestos interferentes que no permiten observar un perfil bien resuelto.

Figura 4- 3: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Trehalosa.



A: Se sembraron 2.2 ml de F1 FNR de FPLC (1.12 mg de proteína total), en una columna de 2ml, flujo 0.5 ml/min. Se recolectaron dos fracciones, una no retenida F1 FNR, y una retenida (F1 FR), la cual fue eluida con Tris HCl 50 mM pH 8.3. **B:** SDS PAGE-Tricina 10%, las muestras se calentaron (+Δ) en ausencia de reductor (-DTT). MW: marcador de peso molecular de bajo rango. Se colocaron 50μg proteína total /carril.

El título específico obtenido por medio de aglutinación con eritrocitos O fue menor con respecto a la fracción retenida, lo que demuestra que la LTC no reconoce el disacárido acoplado a la resina, y, por lo tanto, una parte de la lectina eluye en la fracción retenida (**Tabla 4- 2**). Sin embargo, la fracción retenida (F1 FR) podría ser un paso previo de purificación.

Tabla 4- 2: Fracciones obtenidas cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa.

| Fracción* | mg/ml | mg | Actividad** | Título # |
|-----------|-------|------|-------------|----------|
| F1 FNR | 0.66 | 0.99 | ++ | 4.12 |
| F1 FR | 0.13 | 0.26 | + | 3.25 |

*: Las fracciones fueron dializadas previa estimación de la concentración. **: Suspensión de eritrocitos O al 2%.

#: Cantidad mínima de proteína (μg) requerida para observar aglutinación. Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación].

4.1.4 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA

Teniendo en cuenta que algunas lectinas aisladas de algas rojas son glicoproteínas, se realizó cromatografía de afinidad sobre Concanavalina A (ConA), la cual es una buena estrategia para el aislamiento de glicoconjugados, como lectinas de origen vegetal que no son de fácil purificación. En general se emplea en estrategias para aislar N-glicoproteínas/N-glicanos (Cummings et al., 2017; Jang et al., 2020), dada la afinidad de esta lectina por α -glucosa/ α -manosa y N-glicanos que presentan “core de manosas”.

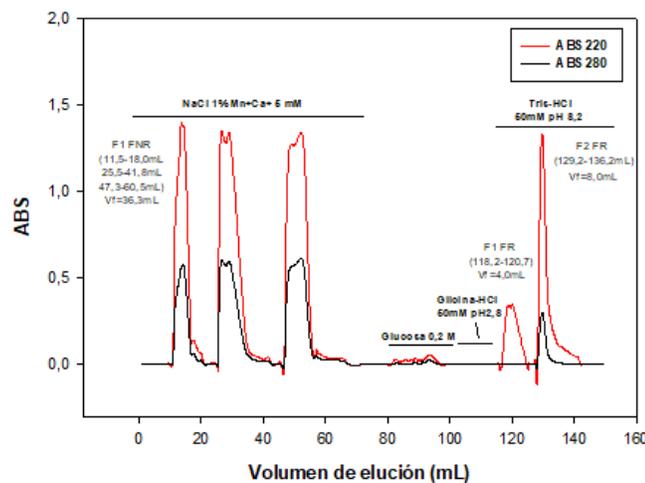
12.5 mL de una fracción activa aislada por intercambio iónico (F1 FNR, 0.44 mg/ml) se colocaron en la columna en tres partes; en el perfil (**Figura 4- 4**) se observan 3 fracciones no retenidas, y la retenida solo se obtuvo por adición del buffer Tris-HCl pH 8.3, donde se presentó actividad aglutinante ambas fracciones (F1 FNR y F1 FR) aunque el título específico de aglutinación fue menor en la fracción retenida (**Tabla 4- 3**); por consiguiente, hay una fracción de LTC que no es retenida.

Tabla 4- 3: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA.

| Fracción* | mg/ml | mg totales | Actividad** | Título# |
|-----------|-------|------------|-------------|---------|
| F1 FNR | 0.67 | 0.99 | ++ | 4.12 |
| F1 FR | - | - | - | - |
| F2 FR | 0.40 | 0.20 | ++ | 3.00 |

*: Las fracciones fueron dializadas previa estimación de la concentración. **: Sobre suspensión de eritrocitos O. #: Cantidad mínima de proteína (μ g) requerida para observar aglutinación. Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación].

Figura 4- 4: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA.

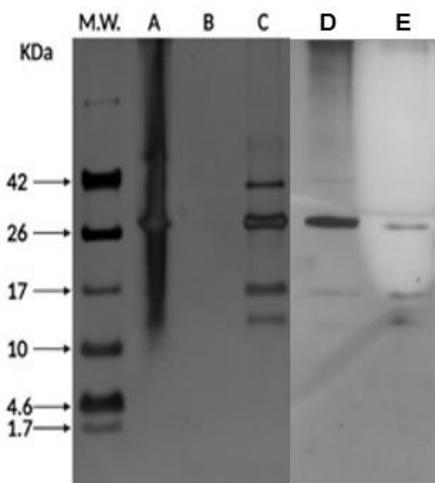


Se colocaron 5.5 mg de la F1 FNR de DEAE-Sepharosa A-50. Volumen de columna 2ml, flujo 0.5 ml/min. Se colectaron tres fracciones, F1 FNR, F1 FR y F2 FR.

Por SDS-PAGE se observaron cuatro bandas bien definidas en la fracción retenida y con mayor intensidad la correspondiente a 29 kDa, que también se observa en la fracción no retenida. En condiciones reductoras, se observa una disminución de la intensidad de la banda de 29kDa y un aumento de las bandas de bajo peso molecular (**Figura 4- 5 D, E**); que podría indicar la presencia de puentes disulfuro intercatenarios, con subunidades de aproximadamente 15 kDa; sin embargo, se deben hacer más estudios. Lo que indicaría la presencia de cisteínas, aunque en lectinas de algas rojas, hay un bajo porcentaje de este residuo (Leite et al., 2005), si bien para algunas se reporta la presencia de puentes disulfuro (Nagano et al., 2005b; S. Silva, 2013).

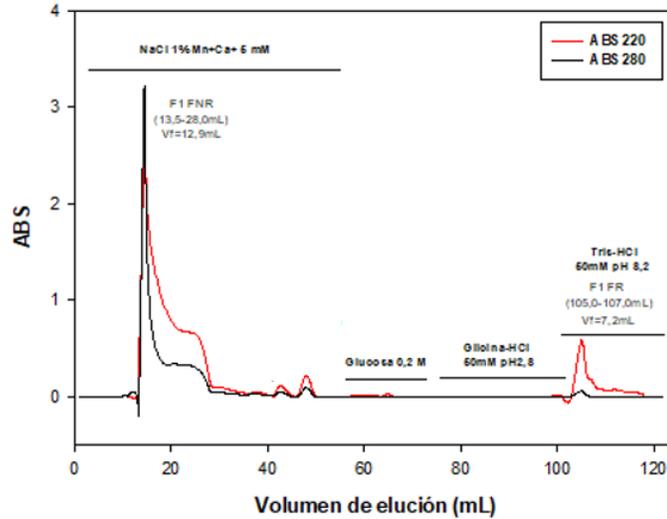
La fracción no retenida fue de nuevo sometida de afinidad sobre Sepharosa 4B Con A (**Figura 4- 6**); se presenta de nuevo una fracción retenida al eluir con buffer Tris-HCl pH 8.2, debido a que el oligosacárido de la lectina es reconocido con menor afinidad y por lo tanto no se retiene toda la LTC aun dejando la interacción durante 24 horas a 4 °C. Sin embargo, la actividad en la fracción no retenida (FNR) (+3) fue mayor con respecto a la LTC retenida, que podría deberse probablemente a que no toda la LTC esta glicosilada. Con la FNR se hicieron ensayos de inhibición de carbohidratos (**Tabla 4- 4**), y se corroboró que el mejor azúcar inhibidor fue la glucosa (3.2), lo que implicaría que no toda la lectina esta glicosilada o podrían presentarse más de una lectina en el extracto de *T. cylindrica*, con diferente especificidad, aunque se precisa llevar a cabo estudios adicionales.

Figura 4- 5: SDS PAGE-tricina 10% Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA.



SDS PAGE -Tricina 10%. Muestras se sometieron a calentamiento (Δ) en ausencia de reductor (-DTT): A) F1 FNR, B) F1 FR, C) F2 FR. Se colocaron 50 μ g proteína/carril. D) F2 FR 20 μ g proteína. E) F2 FR 20 μ g proteína + DTT. MW: marcador de bajo peso molecular.

Figura 4- 6: Recromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-ConA.



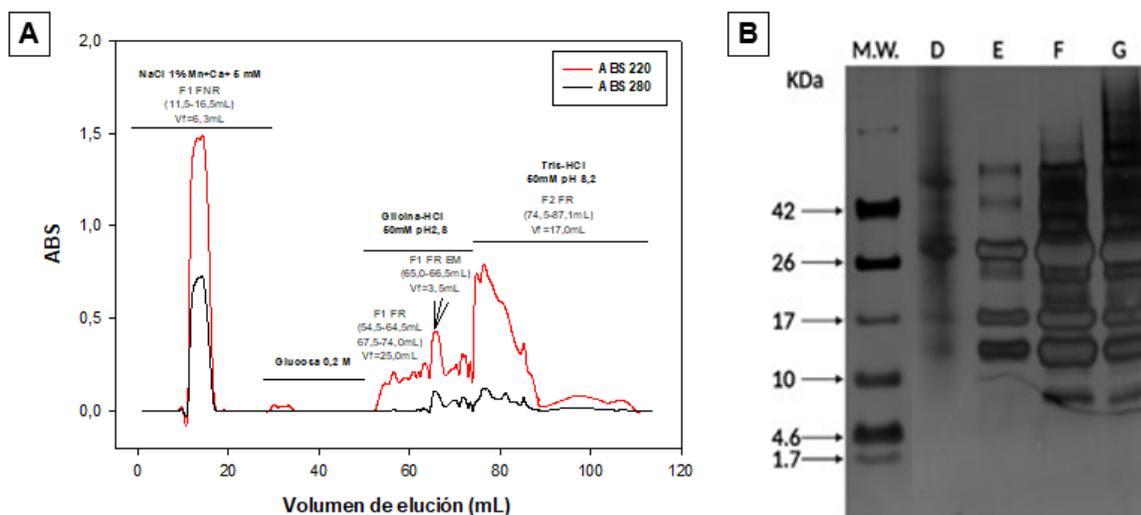
Muestra sembrada: 1.5 ml de F1 FNR ConA con concentración 0.67 mg/ml, 1 mg de proteína total (+2). Volumen de columna 2ml, flujo 0.5 ml/min. En el perfil se obtuvieron dos fracciones, F1 FNR 0.61 mg/ml (+3), F1FR de 0.60 mg/ml (+).

Tabla 4- 4: Ensayos de Inhibición fracción no retenida (F1 FNR) recromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B ConA

| Carbohidrato | Concentración (M) | Aglutinación ^{2,3} |
|---|-------------------|-----------------------------|
| Control | | ++ |
| Lactosa | 0.2 | ++ |
| GalNAc | 0.2 | ++ |
| Galactosa | 0.2 | ++ |
| p-nitrofenil-galactosido | 37 ¹ | ++ |
| Glucosa | 0.2 | + |
| N-Acetil-α-D-glucosamina | 0.3 | ++ |
| p-nitrofenil-N-acetil-β-D-galactopiranosido | 37 ¹ | ++ |

¹mM. ²Sobre suspensión de eritrocitos O. ³Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación].

Para corroborar los resultados mencionados se sembraron 4.0 ml de una fracción activa no retenida por FPLC (previamente sometida a intercambio en columna abierta) (0.8 mg/ml, (+2)), se obtuvieron 4 fracciones, una no retenida (F1 FNR), dos eluidas con Glicina HCl pH 2.8 (F1 FR y F1 FR EM) y una eluida con Tris-HCl pH 8.2 (F2 FR) (**Figura 4- 7**).

Figura 4- 7: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA muestra F1 FNR FPLC.

A: Cromatograma, 4.0 ml de F1 FNR de FPLC (3.2 mg de proteína total (+2)). Volumen de columna 2ml, flujo 0.5 ml/ min. Se colectaron cuatro fracciones, una no retenida F1 FNR, y tres retenidas, dos eluidas con Glicina-HCl F1 FR y F1 FR EM, y una eluida con Tris HCl F2 FR. **B:** SDS PAGE 10% Tris-tricina + Δ -DTT. D) F1 FNR, E) F1 FR, F) F1 FR EM, G) F2 FR. MW: marcador de peso molecular. 50 μ g proteína/carril.

Todas las fracciones presentaron diferencias en el título de aglutinación (**Tabla 4- 5**); por SDS-PAGE en las fracciones retenidas se observaron numerosas bandas (**Figura 4- 7**), entre ellas una predominante alrededor de 29-30 kDa, que correspondería con la LTC. La mínima cantidad de proteína en las fracciones retenidas para observar aglutinación estuvo entre 1.5-3 μ gs totales, lo que indica que hay una cantidad apreciable de lectina en estas fracciones para continuar con los ensayos de purificación; aunque el paso adicional de cromatografía de intercambio usando FPLC no es determinante, si se compararan los dos métodos de intercambio empleados.

Tabla 4- 5: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-ConA

| Fracción* | mg/ml | mg totales | Actividad** | Título # |
|-----------|-------|------------|-------------|----------|
| F1 FNR | 0.57 | 0.63 | ++ | 3.56 |
| F1 FR | 0.64 | 0.38 | ++ | 4.00 |
| F1 FR EM | 0.27 | 0.14 | ++ | 1.69 |
| F2 FR | 0.92 | 0.46 | ++ | 2.88 |

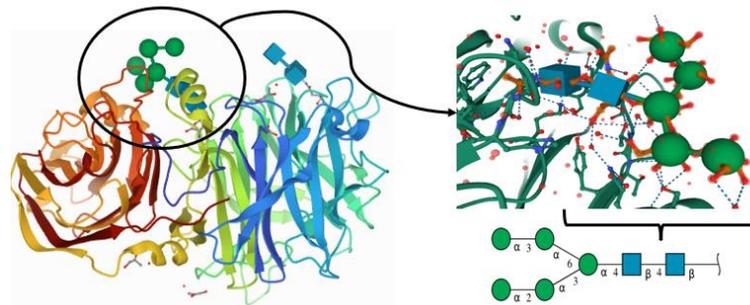
*: Las fracciones fueron dializadas previa estimación de la concentración. **: Sobre suspensión de eritrocitos O al 2%. #: Cantidad mínima de proteína (μ g) requerida para observar aglutinación.

4.1.5 Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa

Debido a que se ha reportado una gran cantidad de lectinas de algas rojas específicas por glicanos ricos en manosa, se decidió utilizar una columna acoplada a invertasa, esta es una glicoproteína con alrededor de un 45% de manosa y residuos de glucosa (Vattuone et al., 1991) (**Figura 4- 8**), que se ha utilizado en el aislamiento de varias lectinas (Torres, 2010).

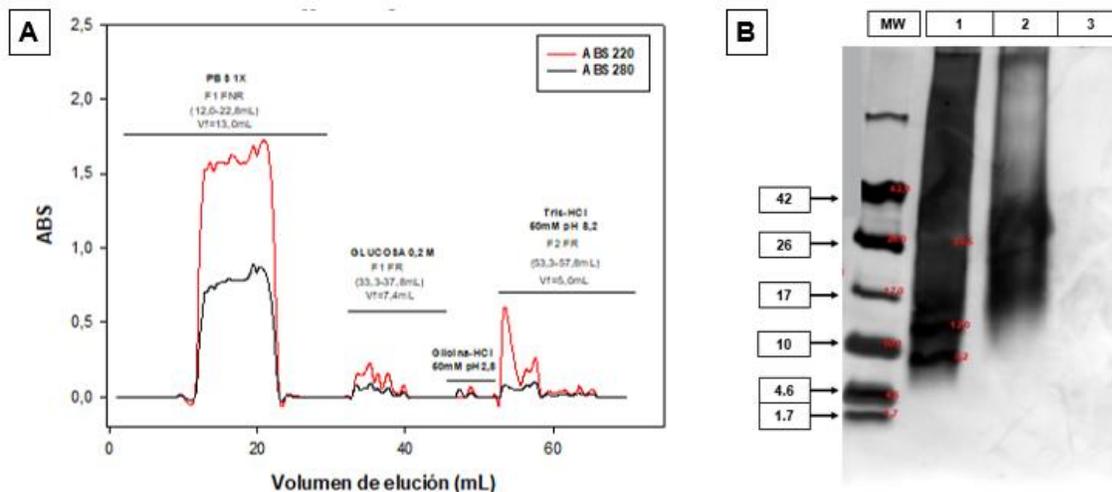
12.5 mL de una fracción activa aislada por intercambio iónico (F1 FNR, 0.44 mg/ml) se sembraron en la columna de Sepharosa 4B-Invertasa, en el perfil se obtuvieron tres fracciones, una no retenida (F1 FNR) y dos retenidas, F1 FR eluidas con glucosa y F2 FR Tris-HCl pH 8.3. Por SDS-PAGE no se observaron bandas resueltas, aunque para la no retenida se evidencia un bandeo con menores pesos moleculares (**Figura 4- 9**).

Figura 4- 8: Oligosacárido alto en manosa presente en la invertasa aislada de *Arabidopsis thaliana*.



N-glicosilación presente en la cadena B de la invertasa aislada de *Arabidopsis thaliana*. α -D-manopiranosas-(1-2) - α -D-manopiranosas-(1-3) - [α -D-manopiranosas-(1-3) - α -D-manopiranosas-(1-6)] α -D-manopiranosas-(1-4) -2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosas-(1-4) -2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosas. Fuente: (Sehnal et al., 2021; Verhaest et al., 2006). **Círculos verdes:** manosa, **Cuadros azules:** Glucosa.

Figura 4- 9: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa muestra F1 FNR DEAE-Sepharosa.



A: perfil cromatográfico muestra sembrada 12.5 ml de F1 FNR de DEAE-Sepharosa, 5.5 mg de proteína total (+3). Volumen de columna 2ml, flujo 0.5 ml/min. Se colectaron tres fracciones, F1 FNR y dos retenidas, F1 FR eluidas con Glucosa 0.2M y Tris HCl pH 8.2. **B:** SDS PAGE-Tricina 10%, muestras con calentamiento (+Δ), sin reductor (-DTT). Línea 1: F1 FNR, Línea 2: F1 FR, Línea 3: F2 FR. MW: marcador de peso molecular. 50μg proteína/carril.

La actividad de aglutinación sobre eritrocitos O (+2) (**Tabla 4- 6**) solo se encontró en la fracción no retenida, F1 FNR (**Anexo F, Figura F- 1**). Los resultados muestran que la lectina no tiene especificidad por manosa como se mencionó previamente (**3.2**), ni tampoco reconoce los residuos de glucosa internos en el oligosacárido. No obstante, es importante continuar los estudios de la fracción retenida dado que por lo general en todas las especies se presentan lectinas con diferente especificidad.

Tabla 4- 6: Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Invertasa.

| Fracción* | mg/ml | mg totales | Actividad** | Título # |
|-----------|-------|------------|-------------|----------|
| F1 FNR | 0.67 | 0.94 | ++ | 8.4 |
| F1 FR | 0.93 | 0.56 | - | - |
| F2 FR | - | - | - | - |

*: Las fracciones fueron dializadas previa estimación de la concentración. **: Sobre suspensión de eritrocitos O. #: Cantidad mínima de proteína (μg) requerida para observar aglutinación.

En la **Tabla 4- 7** se presentan las diferentes etapas de purificación de la LTC y se resaltan aquellas donde se obtuvieron los mejores grados de purificación, además se observaron bandas de buena calidad por SDS PAGE. Con respecto a la cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-ConA, los resultados muestran que probablemente la LTC se podría presentar en dos formas, glicosilada o no glicosilada, o se podrían presentar otras lectinas de acuerdo con lo encontrado en diferentes organismos marinos, donde hay presencia de

hasta 20 lectinas, por ejemplo, en peces e invertebrados, se han encontrado los lectomas más diversos (**Tabla 4- 8**); si se conoce el genoma de un organismo se puede hacer uso de herramientas bioinformáticas para la predicción de su lectoma, con el uso de la base de datos LectomeXplore de UniLectin; se presenta un ejemplo de los lectomas del hongo *Laccaria bicolor* y del coral blando *Dendronephthya gigantea* en el **Anexo G, Figura G- 1** (Bonnardel et al., 2021b; Lebreton et al., 2021).

Tabla 4- 7: Resumen de las etapas de purificación de la LTC.

| Etapa | mg/ml | Título específico | Grado de purificación ¹ |
|-----------------------|-------|-------------------|------------------------------------|
| ETc2UD | 1.63 | 1.2 | 1 |
| F 50-80% _s | 2.26 | 2.0 | 1.6 |
| F1 FNR ² | 0.86 | 17.4 | 14.5 |
| F1 FNR ³ | 0.80 | 2.5 | 2.0 |
| F1FR ⁴ | 0.34 | 5.8 | 5.0 |
| F2FR ⁴ | 0.89 | 8.9 | 7.4 |
| FR5 FR ⁴ | 0.15 | 13 | 11.0 |
| F1FREM ⁵ | 0.27 | 29.6 | 25.0 |
| F2 FR ⁵ | 0.92 | 8.6 | 7.2 |
| F2 FR ⁵ | 0.40 | 20 | 17.0 |

1.El título específico es definido como el título de aglutinación dividido por la concentración de proteína (mg/mL).2. Cromatografía de intercambio sobre DEAE Sephadex A-50. 3. Cromatografía de intercambio iónico en FPLC.4. Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Glc 5. Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-ConA.

Tabla 4- 8: Lectomas en diferentes organismos marinos.

| Phylum | Especie | Descripción | No. Clases de lectinas* |
|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Brachiopoda | <i>Lingula unguis</i> | Braquiopodo primitivo | 26 |
| Chordata | <i>Branchiostoma floridae</i> | Pez lanceta | 24 |
| Chordata | <i>Esox lucius</i> | Pez lucio | 20 |
| Cnidaria | <i>Acropora millepora</i> | Coral | 19 |
| Cnidaria | <i>Actinia tenebrosa</i> | Anemona | 23 |
| Cnidaria | <i>Dendronephthya gigantea</i> | Coral | 24 |
| Cnidaria | <i>Exaiptasia diaphana</i> | Anemona | 23 |
| Cnidaria | <i>Orbicella faveolata</i> | Coral | 23 |
| Cnidaria | <i>Pocillopora damicornis</i> | Coral | 20 |
| Cnidaria | <i>Stylophora pistillata</i> | Coral | 22 |

*Score superior a 0.25 LectomeXplore de UniLectin. Fuente: (Bonnardel et al., 2021b).

Los ensayos de purificación nos permitieron aislar parcialmente la LTC en proporciones bajas, donde se evidenció siempre una banda en SDS PAGE de 29 kDa. Por otra parte, por medio de Sepharosa 4B-ConA, se obtuvo un mejor perfil, un mayor porcentaje de la fracción retenida con una mayor proporción de la banda de 29 kDa, esto implica que sería el método para continuar la purificación y obtener la LTC en mayores cantidades para hacer estudios de estructura y función.

Los porcentajes de recuperación de las lectinas de algas son variados, se han reportado valores de 0.5% para la lectina de *Vidalia obtusiloba* (Melo et al., 2004) o 1.03% para GOL de *Gracilaria ornata* (Leite et al., 2005) hasta valores altos como 71% para ESA-2 de *Eucheuma serra* (Kawakubo et al., 1997) o 54.32% para BPL-2 de *Bryopsis plumosa* (Han et al., 2010) de acuerdo con el método de purificación (**Tabla 4- 9**). Para la LTC a partir de 10.4 mg de proteínas totales del precipitado obtenido con sulfato de amonio del 50-80%, se obtiene por cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Glc 1 mg de LTC, que equivale al 9.6% de la proteína total.

Tabla 4- 9: Porcentaje de recuperación para algunas lectinas aisladas de algas.

| Especie | Lectina | Método de purificación | % Recuperación | Referencia |
|--------------------------------|---|---|----------------|-------------------------|
| <i>Pterocladia capillacea</i> | PcL (5.8 kDa*) | F 50-80% ^Δ , Cromatografía de afinidad en goma Guar. | 27.4 | (Oliveira et al., 2002) |
| <i>Gracilaria ornata</i> | GOL (17kDa**, 17.4kDa*) | F 0-70% ^Δ , Cromatografías: DEAE-Celulosa y afinidad Sepharosa 4B-Mucina. | 1.03 | (Leite et al., 2005) |
| <i>Vidalia obtusiloba</i> | Lectina de <i>V. obtusiloba</i> (78.9 kDa*) | F 0-60% ^Δ , Cromatografías: DEAE-Celulosa y afinidad Sepharosa 4B-Mucina | 0.15 | (Melo et al., 2004) |
| <i>Eucheuma serra</i> | ESA-1 | Precipitación con etanol hasta 83%, Filtración en gel Superdex 75 pg, Cromatografía de intercambio iónico columna TSK gel DEAE-5PW. | 7.00 | (Kawakubo et al., 1997) |
| | ESA-2 | | 71.0 | |
| <i>Tricleocarpa Cylindrica</i> | LTC | Precipitado 50-80% y Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Glc | 9.6 | Este trabajo |
| <i>Bryopsis plumosa</i> | Bryohealin | Cromatografía de afinidad Agarosa- Acetil-d-glucosamina | 1.46 | (Kim et al., 2006) |
| <i>Bryopsis plumosa</i> | BPL-2 | Cromatografía de afinidad Agaroda-N-acetil-galactosamina | 54.32 | (Han et al., 2010) |

*: determinado por filtración en gel. **: determinado por SDS-PAGE. ^Δ: aislamiento con sulfato de amonio. Color verde: algas verdes, Color rojo: algas rojas.

Las diferencias en los porcentajes de recuperación, además de la fuente, también se explican por su proporción en las algas marinas, por ejemplo, en *Eucheuma serra* la lectina

ESA-2 está en un alto porcentaje con respecto a ESA-1 (7%) (Kawakubo et al., 1997). Por otra parte, se ha reportado que las lectinas de algas marinas son muy diversas con pesos moleculares desde 3.5 kDa en su forma monomérica para el alga roja *Bryothamnion triquetum* y hasta los 76 kDa para la aislada de *Gracilaria verrucosa* (Singh & Walia, 2018) (Tabla 4- 10).

Tabla 4- 10: Lectinas de algas rojas pesos moleculares

| Alga Roja | (kDa) | Alga Roja | (kDa) |
|--|---------------------------|---|----------------------------|
| <i>Agardhiella tenera</i> | 13, 12 ^Δ | <i>Hypnea japonica</i> | 8.5–9.5 |
| <i>Aglaothamnion callophyllidicola</i> | 50* y 14 | <i>H. japonica</i> | 4- 12 |
| <i>Bryothamnion seaforthii</i> | 4.5 ^Δ | <i>H. cervicornis</i> | 9 |
| <i>B. triquetum</i> | 3.5 ^Δ | <i>H. musciformis</i> | 9.3 [#] |
| <i>Carpopeltis flabellata</i> | 25 | <i>Kappaphycus alvarezii</i> | 28 |
| <i>Cystoclonium purpureum</i> | 6.2* ^Δ | <i>K. striatum</i> | 28 |
| <i>Enantiocladia duperreyi</i> | 16 | <i>Palmaria palmata</i> | 20* |
| <i>Eucheuma amakusaensis</i> | 29 | <i>Pterocladia capillacea</i> | 5.8 ^Δ |
| <i>E. cottonii</i> | 29 | <i>Ptilota filicina</i> | 19.3** |
| <i>E. serra</i> | 29 | <i>P. plumosa</i> | 17.4** |
| <i>Georgiella confluens</i> | 21.5 ^Δ | <i>P. serrata</i> | 18.3** |
| <i>Gracilaria cornea</i> | 60 | <i>Serraticardia maxima</i> | 25 |
| <i>G. ornata</i> | 17 | <i>Solieria chordalis</i> | 35 |
| <i>G. tikvahiae</i> | 29.7* -24.9* ^Δ | <i>S. filiformis</i> | 28 |
| <i>G. verrucosa</i> | 12 y 10.5* ^Δ | <i>S. robusta</i> | 29 |
| <i>G. verrucosa c</i> | 76 | <i>Tichocarpus crinitus</i> | 41 |
| <i>G. verrucosa d</i> | 71 | <i>Vidalia obtusiloba</i> | 59.6* y 15.2* ^Δ |
| <i>Griffithsia sp.</i> | 13 | <i>Tricleocarpa cylindrica</i> [#] | 29 |

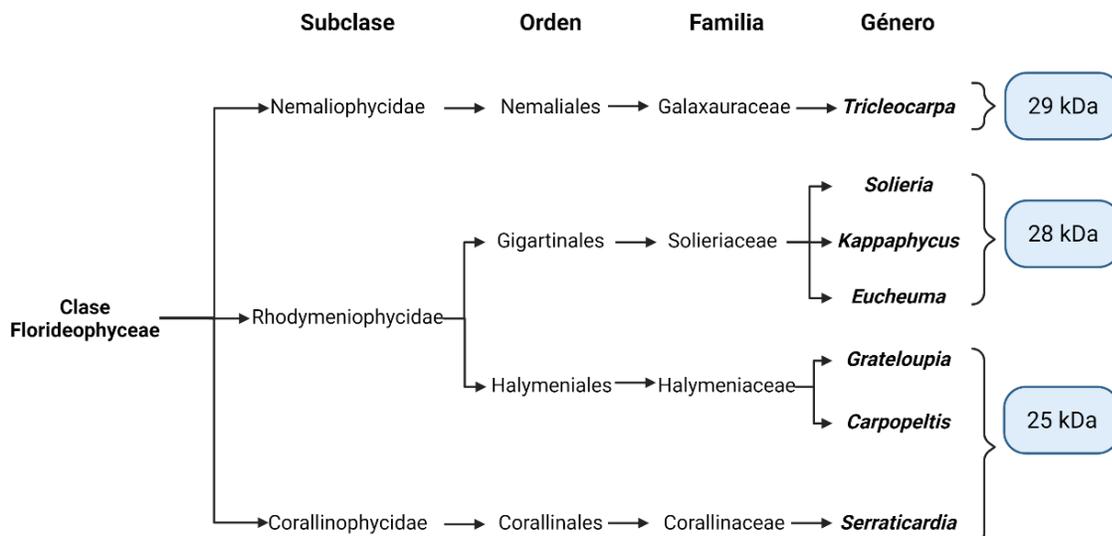
*: dímero, **: trímero. Todos los pesos moleculares se determinaron por SDS-PAGE los señalados con: (Δ) fueron obtenidos por filtración en gel, (#): peso molecular determinado con MALDI-TOF/MS. Fuente: modificado de (Singh & Walia, 2018).

Algunas lectinas se asocian en diferentes formas oligoméricas por interacciones débiles; otras tienen pesos moleculares en SDS PAGE similares a la de *T. cylindrica* (~29 kDa), para las aisladas del género *Eucheuma*, *E. amakusaensis*, *E. cottonii* (Kawakubo et al., 1997), *E. serra* (Hori et al., 2007) y *Solieria robusta* (Hori et al., 1990). Las aisladas de *Solieria filiformis*, SfL-1 y SfL-2 (Chaves et al., 2018b), *Kappaphycus striatum*, y *K. alvarezii*, con 28 kDa para cada una de ellas (Hung le et al., 2011; Le et al., 2009). Otras como las de *Grateloupia chiangii* (GCL) (Hwang et al., 2020), *Serraticardia maxima* y *Carpopeltis flabellata* con un peso de 25 kDa (Hori et al., 1990; Shiomi et al., 1980) (Tabla 4- 10).

Todas las especies anteriormente mencionadas son algas rojas; para algas verdes hay lectinas con pesos moleculares cercanos a 24 kDa para *Caulerpa cupressoides* (Benevides et al., 2001), *Ulva pertusa* (S. Wang et al., 2004), y *Bryopsis plumosa* (Kim et al., 2006).

En lo que respecta a la cercanía taxonómica, se evidencia como las lectinas de pesos cercanos a 28kDa, géneros *Kappaphycus*, *Solieria* y *Eucheuma*, comparten la misma Subclase Rhodymeniophycidae, Orden Gigartinales y Familia Solieriaceae, diferenciándose solo hasta el nivel de género, por su parte, *Tricleocarpa* pertenece a una subclase diferente, Nemaliophycidae, aunque pertenece a la misma clase Florideophyceae, indicando que conservan cierta cercanía evolutiva. Las que tienen pesos cercanos a 25kDa, géneros *Grateloupia*, *Carpopeltis* y *Serraticardia*, comparten el pertenecer la misma clase y a la Subclase Corallinophycidae (**Figura 4- 10**).

Figura 4- 10: Árbol filogenético de los géneros cuyas lectinas aisladas presentan pesos moleculares cercanos a los de la aislada de *T. cylindrica*.



Fuente: Algaebase.org. Figura realizada en Biorender®

Se pueden presentar características bioquímicas similares en lectinas, aisladas de algas marinas que no son muy cercanas taxonómicamente. Adicionalmente, para las lectinas que han sido estudiadas de la misma familia o género, se han reportado diferencias como la especificidad por glicanos (Hori et al., 1990; Singh & Walia, 2018), que indicaría una gran variación independiente del taxa.

Los resultados de afinidad indican que LTC se puede aislar usando preferentemente el soporte de Sepharosa 4B-ConA con la muestra proveniente de intercambio iónico al obtenerse fracciones activas más limpias en las que la banda de interés se presenta en una mayor proporción respecto a los perfiles resultantes con las demás afinidades.

4.2 HPLC

4.2.1 Metodología

Se utilizó un equipo HPLC VWR HITACHI® con dos columnas, muestras y métodos de elución diferentes. En la primera a partir de una muestra activa retenida en una columna de Trehalosa (0.50 mg/ml, actividad ++ sobre eritrocitos O, 20µl concentrados inyectados correspondientes a 100µg de proteína) (**Anexo H, Figura H- 1**) se utilizó una columna Chromolith HR RP-18e, y la elución se realizó a un flujo de 1mL/min usando agua con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (solución A) y acetonitrilo (CNCH₃) del 70% con 0,1% de TFA (solución B). La detección se hizo a 215 nm. La elución se realizó comenzando con 5 min de solución A, posteriormente se aumentó el %B hasta 15% durante 10 minutos, consecutivamente 60 minutos hasta 30%B y finalmente 19 minutos hasta alcanzar el 70% B para un total de 94 minutos (Lomonte & Calvete, 2017), se incluyó un paso adicional de %B de 100% de 20 minutos.

En el segundo ensayo se utilizó la muestra retenida F2 FR con la columna de Sepharosa-ConA (0.40 mg/ml, actividad ++ sobre eritrocitos O, 20µl inyectados correspondientes a 8µg de proteína). Se utilizó una columna Vydac® Protein & Peptide C18 218TP54. S/N 950103-15-3, la elución se realizó usando Acetonitrilo-TFA 0.1% (B) y Agua-TFA 0.1% (D) como eluyentes, se inició con un %B de 10 y 90% de D por un minuto, posteriormente se realizó un gradiente lineal por 25 min hasta 90%B y 10%D, finalmente se mantuvo este gradiente por 10 minutos adicionales.

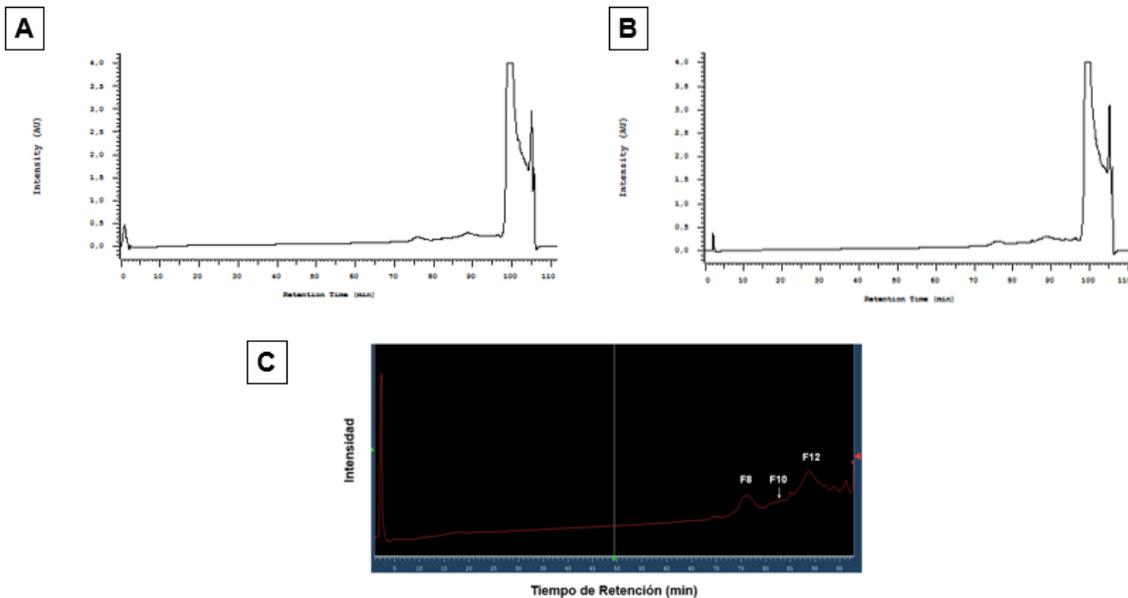
La columna Vydac consta de grupos alifáticos unidos a la superficie de sílice con 300 Å de diámetro de poro, es analítica con tamaño de partícula de 10µm, este tipo de columnas convencionales (empaquetadas) y específicamente la 218TP utilizada son columnas C18 de primera generación efectivas para el aislamiento de péptidos y proteínas de pequeño o mediano peso molecular (Hichrom, 2018) como LTC en estudio. La Cromolith por su parte es una columna de sílice monolítica con una característica estructural de poros bimodales con 140.000 platos teóricos (N/m) (Merck, 2017), esta también permite la separación de péptidos y proteínas pequeñas como la Vydac. La diferencia entre estas dos columnas es su tipo, como se mencionó Vydac es empaquetada y Cromolith monolítica, se considera que las segundas presentan ventajas frente a las convencionales debido a que no se deben utilizar fritas, son versátiles y eficaces requiriendo de un bajo consumo de reactivos,

pero presentan una única desventaja frente a las empaquetadas y es la capacidad de carga, por lo que se limita la cantidad de analito retenido (Domingo, 2018; Hichrom, 2018; Merck, 2017). En lo que respecta a su uso para el aislamiento de LTC según sus características las dos se consideran efectivas, pero se deben tener consideraciones en cuanto al método de elución.

4.2.2 Resultados y Análisis

Las fracciones retenidas sobre Sepharosa 4B Trehalosa (F2 FR) se pasaron por HPLC en fase reversa (C18) (Chromolith HR RP-18e). Inicialmente, se colectaron un total de 14 fracciones, aunque al comparar el perfil de la muestra con el del blanco no se evidenció una separación, debido a que se adicionaron al protocolo 20 min con una concentración de acetonitrilo alta, que llevó a que a los 90 min se presentará un aumento en la señal de absorbancia que enmascara las señales de baja abundancia (**Figura 4- 11**).

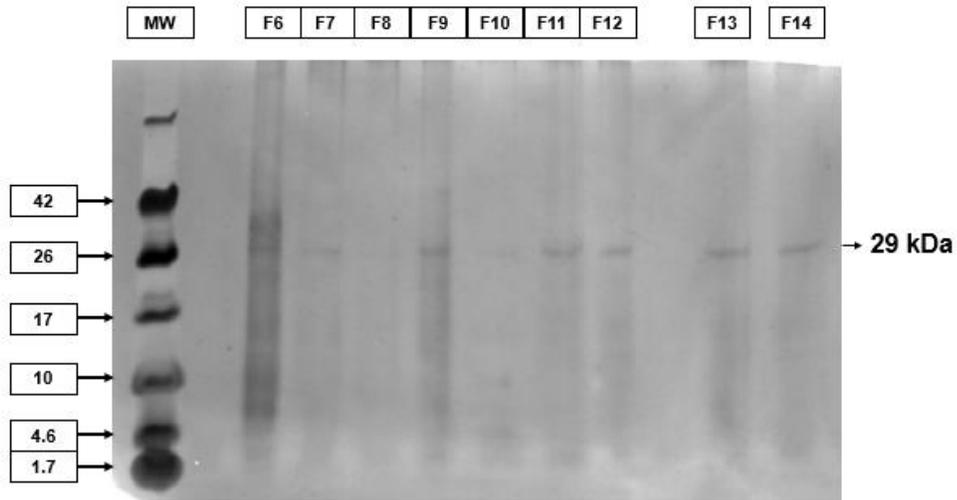
Figura 4- 11: Perfil HPLC muestra F2 FR proveniente de Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B Trehalosa.



A: perfil del blanco de agua TFA 0.1%. **B:** Perfil de la fracción F2 FR, se observa como el perfil del blanco y muestra de interés son similares y no se presenta una separación visible en los perfiles sin embargo en **C** se indica un detalle del perfil de la muestra con las fracciones aisladas de mayor actividad (++ sobre eritrocitos O) F8, F10, F12.

La actividad de aglutinación se encontró en las fracciones colectadas con porcentajes de acetonitrilo mayores al 60%, principalmente en las fracciones, F8, F10 y F12 (**Tabla 4- 11**). Por SDS PAGE para las fracciones F6-F14, se observó solo una banda en 29 kDa, que corresponde a la lectina de estudio (**Figura 4- 12**).

Figura 4- 12: Electroforesis de las fracciones obtenidas F6-F14 por HPLC.



SDSPAGE Tris-Tricina 10%, las muestras se calentaron (+Δ) en ausencia de reductor (-DTT). Muestras F6-F14 obtenidas por HPLC. MW: marcador de peso molecular, 2μg proteína/Carril.

Tabla 4- 11: Purificación por HPLC de la muestra F2 FR Sepharosa 4B-Trehalosa.

| Fracción | (μl) | Min* | Agglutinación** | Concentración (μg/ml) |
|----------|------|-----------|-----------------|-----------------------|
| F1 | 100 | 1-2 | - | 10 |
| F2 | 100 | 2-2.4 | - | 10 |
| F3 | 100 | 36.5 | - | 10 |
| F4 | 100 | 39.5-40 | - | 10 |
| F5 | 100 | 65.5 | - | 60 |
| F6 | 100 | 71.5-72 | - | 30 |
| F7 | 100 | 72.5-73 | ± | 20 |
| F8 | 400 | 73-76 | ++ | 70 |
| F9 | 200 | 80.5-82.8 | ± | 60 |
| F10 | 100 | 82.8-84 | ++ | 120 |
| F11 | 100 | 84.5-85.7 | ± | 100 |
| F12 | 500 | 85.7-93 | ++ | 100 |
| F13 | 100 | 93.5-94 | ± | 60 |
| F14 | 100 | 95.7-97 | ± | 40 |

*: tiempo de retención, **: Se realizó con una suspensión de eritrocitos O al 2%. Escala cualitativa de aglutinación [0 no hay (+4) máxima aglutinación].

Para purificar lectinas en algas marinas la cromatografía de intercambio iónico es una técnica de uso común, especialmente de las pertenecientes al Phylum Rhodophyta, de tal manera que para algunas lectinas como la de *Soliera filiformis* es eficiente para obtener la proteína pura (Chaves et al., 2018b). Aunque rutinariamente se requiere una combinación de métodos cromatográficos para el aislamiento, generalmente el intercambio iónico es un paso previo a la cromatografía de afinidad. Otras se pueden aislar solo por afinidad como las del género *Ptilota*, *P. filicina* (Sampaio et al., 1998a), *P. plumosa* (Sampaio et al., 2002) y *P. serrata* (Sampaio et al., 1998b).

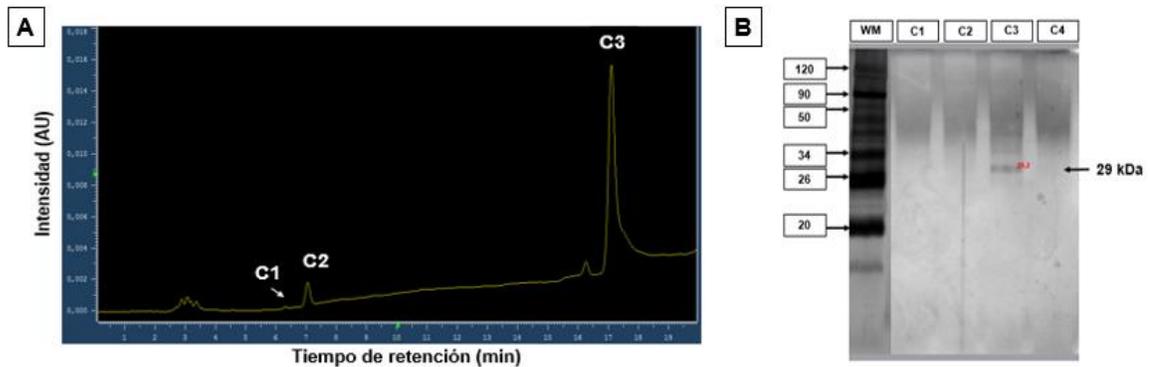
Cabe resaltar que algunas lectinas de esta fuente no pueden aislarse con el uso combinado de las dos técnicas cromatográficas mencionadas y se debe recurrir a métodos más sensibles, en el caso de la lectina de *Hypnea cervicornis* (HCA), la cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Sephacel) es un paso previo a la purificación usando HPLC en fase reversa (Columna Lichrospher RP100 C18 de tamaño de partícula 25 × 0.4 cm, 5 µm) (Nascimento et al., 2006), esto también aplica para la LTC pues el uso de cromatografía de intercambio iónico seguida de afinidad no son suficientes para su aislamiento, el método de elución de HCA es similar al utilizado en el presente trabajo para el aislamiento de la lectina de *T. cylindrica* (LTC); se inicia con un gradiente isocrático (5% acetonitrilo (B)) durante 5 minutos, seguido de gradientes de 5% a 35% de B durante 10 minutos, 35% a 45% de B durante 10 minutos y 45% a 75 % disolvente B, la lectina eluye en el gradiente de 35-45% (Nascimento et al., 2006), las diferencias en los %B para la elución de LTC respecto a lo reportado en HCA pueden deberse a la diferencia en su composición de aminoácidos, se podría inferir como para LTC se pueden presentar una mayor proporción de residuos de aminoácidos hidrofóbicos respecto a HCA que hacen necesaria una mayor concentración de acetonitrilo para su elución.

Otras metodologías empleadas para el aislamiento de proteínas de medio y bajo peso molecular son equivalentes en la purificación en lo referente al gradiente de acetonitrilo empleado (Tan et al., 2017). Lo obtenido está en concordancia con los tiempos de retención en los que se detectó la lectina en porcentajes superiores al 65.5% que corresponden a pesos moleculares superiores a 25kDa; aunque también se presentó en fracciones del 93% de acetonitrilo. Probablemente se presentó difusión de la muestra en la columna, considerando que el método es más largo respecto a determinaciones similares para otras lectinas de algas rojas, donde para HCA la elución se realiza en 30 y

para LTC en 120 minutos respectivamente. Los resultados sugieren que este método permite obtener la lectina (LTC), pero se debe realizar en condiciones preparativas para obtener una mayor cantidad de proteína.

En lo respecta a la segunda cromatografía usando la muestra aislada por cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA (0.40 mg/ml, actividad ++ sobre eritrocitos O, 20µl inyectados correspondientes a 8µg de proteína) (Vydac® Protein & Peptide C18. S/N 950103-15-3), se obtuvieron 7 fracciones (**Figura 4- 13, Tabla 4- 12**), de las cuáles solo se presentó actividad en C3 con tiempo de retención de 17-18 minutos en aproximadamente un %B de 65 y de D de 35% (**Tabla 4- 12**); por SDS-PAGE se identificó una única banda que corresponde a la LTC en 29 kDa (**Figura 4- 13**), para las demás fracciones no se obtuvieron bandas.

Figura 4- 13: Perfil HPLC fracciones C1-C3 muestra F2 FR de Sepharosa 4B-Trehalosa.



A: detalle del perfil HPLC indicando las primeras 3 fracciones obtenidas, con detalle en la fracción C3 activa. **B:** SDS-PAGE Tris-Tricina 10%, muestras con calentamiento (+Δ) en ausencia de reductor (-DTT). Muestras C1-C4 obtenidas por HPLC. MW: marcador de peso molecular, 3.5µg proteína/Carril.

Tabla 4- 12: Fracciones HPLC muestra F2 FR ConA.

| Fracción | Tr (min) | µg/µl | µl** | µg Totales | µg aglutinación* | Actividad |
|----------|-----------|-------|------|------------|------------------|-----------|
| C1 | 6.5-6.6 | 0,002 | 100 | 0,21 | 0,05 | - |
| C2 | 6.8-7.3 | 0,008 | 100 | 0,80 | 0,20 | - |
| C3 | 17.0-18.0 | 0,007 | 100 | 0,65 | 0,16 | ++ |
| C4 | 20.0-20.5 | 0,000 | 100 | 0,00 | 0,00 | - |
| C5 | 25.0-25.5 | 0,001 | 100 | 0,08 | 0,02 | - |
| C6 | 27.0-27.2 | 0,055 | 100 | 5,51 | 1,38 | - |
| C7 | 32.8-34.0 | 0,015 | 100 | 1,51 | 0,38 | - |

*Sobre suspensión eritrocitos B al 2%. **: Fracciones concentradas en Speed-Vac y resuspendidas en agua cuantificadas con NanoDrop Tr: Tiempo de retención. Escala de aglutinación (0) ninguna a (+4) más fuerte.

Estos resultados confirman que el uso de HPLC es efectivo para el aislamiento de LTC, dado que se obtiene aglutinación con 0.16 μg de lectina pura; sin embargo, se deben tener consideraciones en cuanto al método de elución y a la columna empleada, en este caso fue más efectiva la columna Vydac® Protein & Peptide C18 218TP54 específica para el aislamiento de proteínas. A partir de los ensayos para la purificación de LTC se propone la metodología final para su aislamiento indicada en el **Diagrama 4- 1**.

Diagrama 4- 1: Metodología para el aislamiento de la lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC).

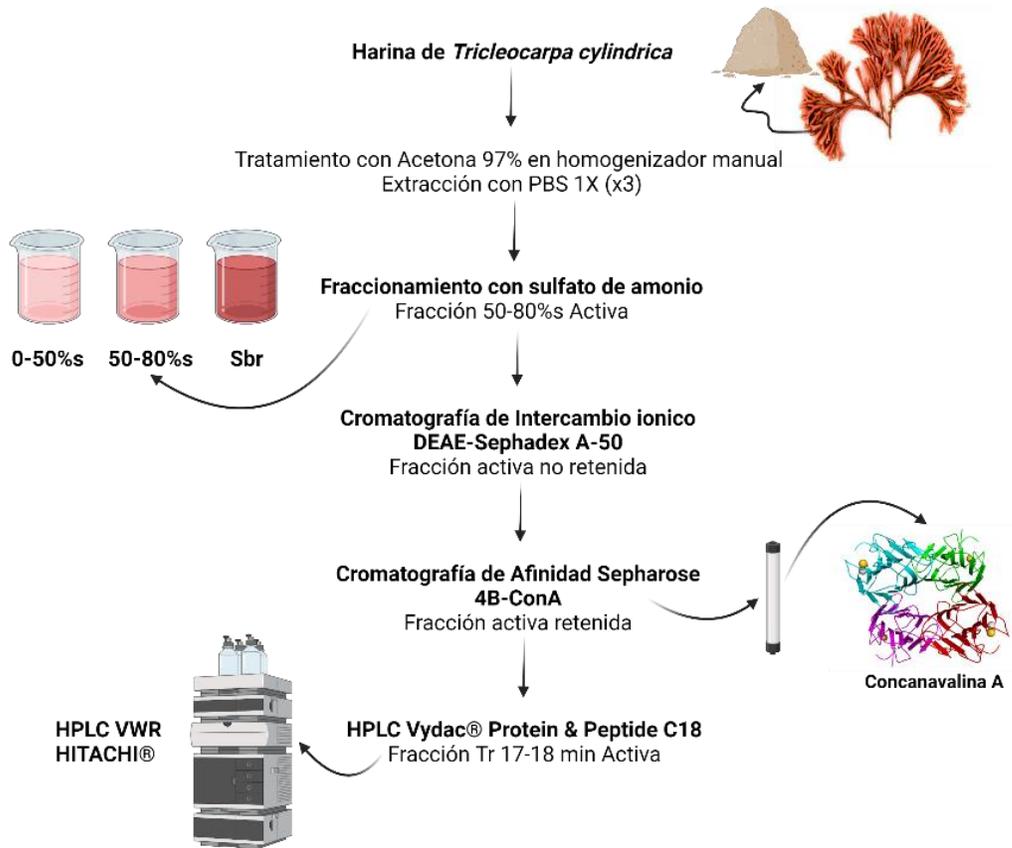


Diagrama realizado en BioRender®.

5. Caracterización parcial de la lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC)

5.1 Metodología

5.1.1 Determinación del punto isoeléctrico

Se hizo en condiciones nativas según la metodología descrita por Bollag & Edelstein (1994) utilizando geles de poliacrilamida al 10% y una mezcla de anfolitos en rangos de pH 5-8 y 3-10 (GE Healthcare AMERSHAN CALIBRATION KITS POR pl (17-0471-01), rango (10.25-2.80)) (**Anexo I**). Se utilizó la muestra activa de LTC aislada por HPLC, en las que se presentó una banda única de 29 kDa se unieron (**F6-F14, Tabla 4- 11**) para formar un pool de concentración 2 mg/ml y se sembraron 20µg/carril.

5.1.2 Ensayos de glicosilación

Teniendo en cuenta la retención de LTC con la columna de afinidad Sepharosa 4B-ConA, se llevó a cabo la detección de carbohidratos por oxidación con metaperiodato de sodio y reacción con hidrazina biotina. La detección se hizo por métodos enzimáticos usando avidina peroxidasa para detectar la biotina, la cual fue ensayada con un panel de lectinas biotiniladas (**Anexo J, Figura J- 1**). La determinación se hizo con la fracción retenida (F1 FR, 0.64 mg/ml) de la cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-ConA y se utilizaron 64µg de proteína por carril.

5.1.3 Efecto del pH y la temperatura

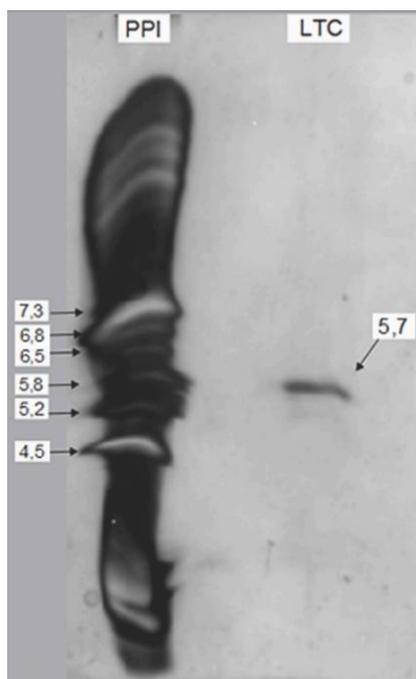
La lectina fue incubada durante 1 hora a diferentes temperaturas, 4°C, 18°C, 37°C, 50°C, 58°C, 70°C y 80°C, luego se adicionó la suspensión de eritrocitos tipo B al 2%, y se dejó la interacción durante 1 h. Para la evaluación del efecto del pH la lectina se resuspendió en

buffer de Glicina-HCl pH 3.0, Citrato-fosfatos pH 5.0, Fosfatos pH 6.5, PBS 1X 7.4, Tris-HCl 9.5, Carbonatos pH 11.0 y solución de Tris-OH pH =12.0, se adicionó la suspensión de eritrocitos tipo B al 2%, y se dejó la interacción durante 1 h. Finalmente se evaluó la aglutinación en forma cualitativa.

5.2 Resultados y Análisis

Se encontró una única banda alrededor de pH=5.7 (**Figura 5- 1**), resultado que concuerda con lo reportado para otras lectinas de algas, donde en general hay valores de pI ácidos entre pH 4-6 (Yoon et al., 2008); estas lectinas presentan una alta proporción de aminoácidos ácidos que explican estos puntos isoeléctricos (pI), aunque se presentan excepciones como la lectina de *Grateloupia chiangii* (GCL) de con un pI de 6.97; en la **Tabla 5- 1**, se presenta un resumen de los pI de varias lectinas estudiadas relacionados con su composición de aminoácidos ácidos, en todas se presenta una proporción mayor al 8% de este tipo de residuos en su secuencia.

Figura 5- 1: Punto isoeléctrico lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC).



PPI: Patrón de punto isoeléctrico, LTC: lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (20µg de proteína total),

Tabla 5- 1: Características moleculares y porcentaje de residuos de aminoácidos ácidos para lectinas aisladas de algas.

| Lectina | Especie | (kDa) | pI | Número de aminoácidos | aminoácidos ácidos | % | Referencia |
|------------|-----------------------------|-------|------|-----------------------|--------------------|------|------------------------|
| ESA | <i>Eucheuma serra</i> | 29 | 4.75 | 268 | 22 | 8.21 | (Hori et al., 2007) |
| GRFT | <i>Griffithsia sp.</i> | 12.7 | 5.39 | 121 | 10 | 8.26 | (Moulaei et al., 2010) |
| Bryohealin | <i>Bryopsis plumosa</i> | 54 | 5.75 | 278 | 26 | 9.35 | (Kim et al., 2006) |
| GCL | <i>Grateloupia chiangii</i> | 24.9 | 6.97 | 231 | 20 | 8,66 | (Hwang et al., 2020) |

En general para todas las lectinas de algas rojas, se presentan pI ácidos, en los que el ácido aspártico (D), ácido glutámico (Q), y aminoácidos hidroxilados están en mayor proporción, aunque la composición de aminoácidos es muy variada (Singh & Walia, 2018; Kozłowski, 2017). Comúnmente, los puntos isoeléctricos para lectinas de algas rojas se encuentran en pHs ácidos y neutros, entre pH 4.0 -7.0 (**Tabla 5- 2**). Las lectinas aisladas de *Bryopsis plumosa* (BPL-3) y de *G. chiangii* (GCL) tienen pI cercanos a 7.0 (Han et al., 2010; Hwang et al., 2020).

Tabla 5- 2: Características moleculares de lectinas aisladas de algas.

| Alga | Características | | | | | Referencia |
|-------------------------------|------------------------------|----------|--------|-------------|----------------------------|-------------------------|
| | Peso Molecular / Subunidades | pH | T (°C) | pI | Contenido de Carbohidratos | |
| <i>Agardhiella tenera</i> | Monómero, 13 | - | - | 6.1 | 2.7% | (Shiomi et al., 1979) |
| <i>Carpopeltis flabellata</i> | Monómero, 25 | - | - | 6.6–6.8 | - | (Hori et al., 1990) |
| <i>Cystoclonium purpureum</i> | Dímero, 6.2 kDa | 4–10 | 50 | 5.60 | 5.6% | (Kamiya et al., 1980) |
| <i>Eucheuma amakusaensis</i> | Monómero, 29 kDa | - | - | 4.9,5.2,5.5 | - | (Kawakubo et al., 1999) |
| <i>Eucheuma cottonii</i> | Monómero, 29 | - | - | 5.0,5.1 | - | (Kawakubo et al., 1999) |
| <i>Eucheuma serra</i> | Monómero, 9 kDa | 2.5–10.5 | 60 | 4.7,4.9 | - | (Kawakubo et al., 1997) |

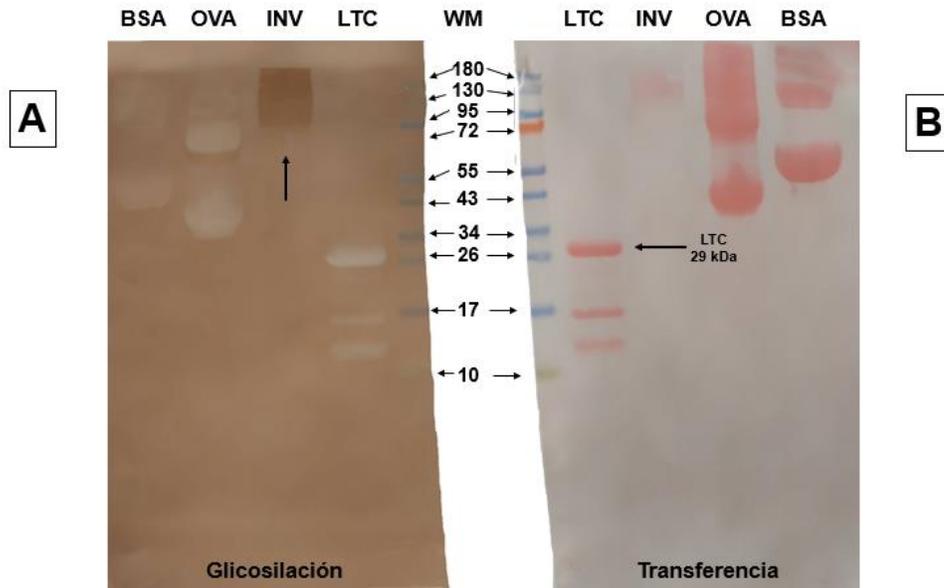
Continuación Tabla 5- 2: Características moleculares en lectinas aisladas de algas.

| Alga | Características | | | | | Referencia |
|--------------------------------|------------------------------|----------|-------|---------------|----------------------------|---------------------------|
| | Peso Molecular / Subunidades | pH | T(°C) | pI | Contenido de Carbohidratos | |
| <i>Gracilaria cornea</i> | Monómero, 60 kDa | - | - | 4.30 | 52.5% | (Lima et al., 2005) |
| <i>Gracilaria cornea</i> | Monómero, 60 kDa | - | - | 4.3 | - | (Lima et al., 2005) |
| <i>Gracilaria ornata</i> | Monómero, 17 kDa | - | - | 5.40 | 2.9% | (Leite et al., 2005)l |
| <i>Gracilaria verrucosa</i> | Monómero, 10.5 kDa | - | - | 4.8 | - | (Shiomi et al., 1981) |
| <i>Kappaphycus striatum</i> | Monómero, 8 kDa | 3–10 | 60 | - | - | (Hung le et al., 2011) |
| <i>Palmaria palmata</i> | Monómero, 20 kDa | - | - | 4.6 | - | (Kamiya et al., 1982) |
| <i>Pterocladia capillacea</i> | Monómero, 8 kDa | 7–10 | 60 | - | - | (Oliveira et al., 2002) |
| <i>Ptilota filicina</i> | Trímero, 19.3 kDa | 4–9 | 50 | - | - | (Sampaio et al., 1998a) |
| <i>Ptilota serrata</i> | Trímero, 18.3 kDa | 6–8 | 80 | - | - | (Sampaio et al., 1998b) |
| <i>Solieria. robusta</i> | Monómero 29 kDa | 6–10 | 40 | 4.1, 4.2, 4.3 | - | (Hori et al., 1990) |
| <i>Tichocarpus crinitus</i> | Monómero, 41 kDa | 7–8 | 50 | 4.93 | 6.9% | (Molchanova et al., 2010) |
| <i>Vidalia obtusiloba</i> | Dímero, 59.6**, 15.2 | - | - | 4.00 – 5.00 | 43.2% | (Melo et al., 2004) |
| <i>Bryopsis plumosa</i> | Monómero, 29 kDa | - | - | - | Glicoproteína | (Kim et al., 2006) |
| <i>Caulerpa cupressoides</i> | Monómero, 23.2 kDa | - | - | - | 11.05% | (Benevides et al., 2001) |
| <i>Ulva fasciata</i> | Monómero 14.5 kDa | 6.0-10.5 | 100 | - | - | (S. Kumar & Barros, 2020) |
| <i>Ulva pertusa</i> | Monómero 23 kDa | 6.0-8.0 | 70 | - | 1.2% | (S. Wang et al., 2004) |
| <i>Tricleocarpa cylindrica</i> | Mónomero, 29 kDa | 3.0-7-4 | 50-80 | 5.7 | Glicoproteína | Este estudio |

De acuerdo con los resultados de purificación por cromatografía de intercambio iónico, se esperaba que la lectina a pH 7.4 estuviera cargada negativamente y por lo tanto se retuviera sobre el soporte de DEAE-Sephadex A-50; sin embargo, en todos los casos la LTC no fue retenida. Lo anterior podría explicarse dado que la fuerza iónica del buffer podría ocasionar que los aniones compitan con los sitios de unión de la resina interfiriendo en su unión. Adicionalmente, la región isoeléctrica (RIE) de la proteína, difiere significativamente entre proteínas; con pI entre 6-8 presentan un RIE alto, las de $pI < 6$ y > 8 un RIE bajo (Widmann et al., 2010). Sin embargo, la LTC no se retiene en las condiciones de pH y fuerza iónica utilizadas.

Para determinar si la LTC es glicosilada dada su retención en el soporte de Sepharosa 4B ConA, se empleó un método que incluye la oxidación de carbohidratos a aldehídos vecinales y su reacción con hidrazina biotinilada, por lo tanto, con el sistema de avidina peroxidasa se puede evidenciar la reacción y detección de oligosacáridos presentes en la proteína. Inicialmente se llevó a cabo la transferencia de las proteínas que se verificó con rojo Ponceau (**Figura 5- 2**); aunque solo se observó tinción específica para glicoproteínas con el patrón de invertasa (50% manosas), con glicoproteínas como ovoalbúmina (0.7-3.5%) y BSA (1%), no se pudo detectar la presencia de carbohidratos; tal vez el porcentaje es bajo y no es detectado. De forma similar ocurrió con la LTC, sin embargo, la proteína es retenida en una columna de Sepharosa 4B-Con A. Lo anterior indica que el método no es muy sensible para hacer esta detección para la LTC.

La glicosilación no es usual para la mayoría de las lectinas de algas (S. Silva, 2013) aun cuando en algunas se detectaron porcentajes bajos; por ejemplo las lectina de *Gracilaria ornata* (GOL) del 2.9 % (Leite et al., 2005) y *Ulva pertusa* del 1.2% (S. Wang et al., 2004). Los estudios de oligosacáridos presentes en lectinas de algas son escasos y por lo general las estructuras no son similares a los encontradas en proteínas de plantas y animales, por ejemplo la lectina aislada de *Agardhiella tenera* tiene porcentaje de carbohidratos del 2.9% y en su mayoría tiene residuos de glucosa (Shiomi et al., 1979). En consecuencia, la cantidad y estructura de carbohidratos en algas marinas es variado, como se muestra en la tabla **Tabla 5- 2** donde se reportan porcentajes menores a 2.0% y hasta 52.5% para la aislada de *Gracilaria cornea* (Lima et al., 2005).

Figura 5- 2: Detección de la glicosilación en glicoproteínas y la LTC.

A: Membrana detección de glicosilación, en esta se indica como solo para la proteína INV se presenta glicosilación. INV: Invertasa, LTC: Lectina de *Tricleocarpa cylindrica*, OVA: Ovoalbúmina, BSA: Albúmina de suero bovino, WM: Marcador de peso molecular (kDa). **B:** Verificación de transferencia con rojo Ponceau, la flecha negra indica la banda de 29 kDa correspondiente a LTC. Condiciones de electroforesis previa transferencia: SDS PAGE 10% Tris-tricina + Δ -DTT, de cada muestra se sembraron 50 μ g/pozo.

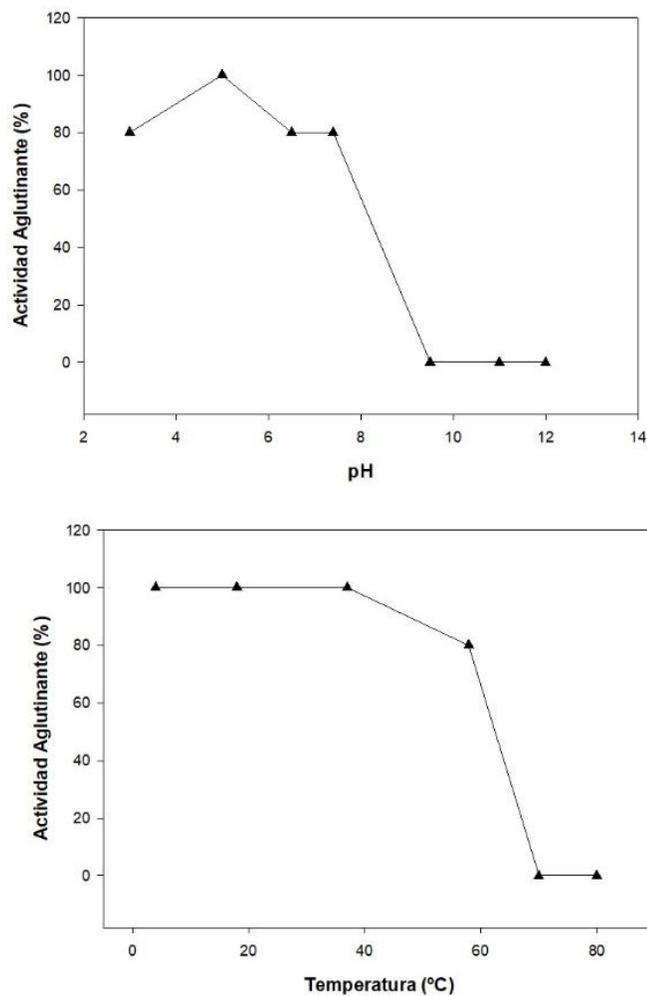
Para la lectina recombinante de Bryohealin, lectina aislada de *Bryopsis plumosa*, se predijeron sitios de O-glicosilación tipo mucina (NetOGlyc 2.0) y N-glicosilación; con un sitio potencial de glicosilación en Asn 193, no obstante en la proteína nativa no se encontró glicosilación (Yoon et al., 2008).

Hoy en día se ha encontrado que los glicanos cumplen funciones biológicas de gran importancia que conducen al tráfico molecular, control de crecimiento, manejo del estrés abiótico y biótico, morfogénesis, entre otras, en la proteína por su parte generan estabilidad e inmunogenicidad (Dumontier et al., 2018; Mathieu et al., 2020). En algas marinas no se han estudiado estas funciones, y como se mencionó solo se reporta el contenido de carbohidratos, por lo tanto es importante su estudio para aportar en el conocimiento de nuevas estructuras y/o usos potenciales de estas glicoproteínas (Dumontier et al., 2018; Mathieu et al., 2020).

Se determinó actividad aglutinante en un rango de pH entre 3-7.4 y de temperatura entre 4-58°C, se evidencia para el pH como se mantiene una actividad del 80% hasta un pH de 7.4 en el que a partir de este valor la actividad decrece a cero a partir de pH básico, en lo

que respecta a la temperatura se mantiene un 100% de la actividad hasta los 40°C y disminuye un 20% al alcanzar los 58°, a partir de 70°C la actividad disminuye en su totalidad a un 0% (**Figura 5- 3**), estos resultados están en concordancia con lo reportado para las lectinas de algas rojas, dado que se reporta un rango amplio, variando de 40 a 80°C (Dinh et al., 2008; Hwang et al., 2020), en general se cree que la estabilidad térmica característica de las lectinas de algas marinas (veáse **Tabla 5- 2**) puede estar relacionada con la estructura tridimensional, su bajo peso molecular (Han et al., 2010), y la presencia de puentes disulfuro (Nagano et al., 2005b; S. Silva, 2013), como ocurre con las lectinas de *Hypnea japonica*, Hypnin A-1 y A-2 (Hori et al., 2000).

Figura 5- 3: Efecto del pH y la temperatura en la actividad.



La actividad aglutinante de 100% (+3) (5,88µg proteína) para la fracción 50-80%. Se evidencia como la actividad se conserva en un rango de pH entre 3-7.4 y de temperatura entre 4-58°C.

La mayoría de las lectinas estudiadas mantienen su actividad en un rango amplio, pH 5-9 (**Tabla 5- 2**) (Singh & Walia, 2018); sin embargo la lectina Bryohealin aislada de *Bryopsis plumosa* presenta mayor actividad a pH alcalino y esta relacionada con su papel fisiológico en la regeneración del protoplasto del tallo cenocítico del alga, este proceso de cicatrización de heridas es el primer reporte directo de la función intrínseca de lectinas en algas (Kim et al., 2006).

Además de su especificidad, la estabilidad de las lectinas de algas en un rango amplio de pH ha demostrado como estas pueden unirse de manera reversible a promotores de absorción que potencien la acción de un fármaco, pudiéndose usar para dirigir estos fármacos al tejido tumoral o para su administración oral, si bien se reconoce la amplia actividad biológica de las lectinas de algas *in vitro*, se considera valioso y necesario realizar estudios de farmacocinética que permitan implementarlas como herramientas clínicas (Singh & Walia, 2018). En general, la actividad en un amplio rango de pH y temperatura se da por la adaptación de estos organismos que ocurre en las zonas tropicales donde habitan. Con los ensayos de caracterización parcial se concluye como LTC es una glicoproteína termoestable (hasta 58°C) con un rango de actividad en un pH de 3-7.4.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Se aisló una nueva lectina de *Tricleocarpa cylindrica* (LTC) con características moleculares similares a otras lectinas estudiadas en algas rojas (**Tabla 6- 1**).
- Para purificar la lectina de debe hacer un tratamiento con acetona, con el fin de evitar la hemólisis de los eritrocitos y obtener extractos sin pigmentos, de esta forma se puede llevar a cabo la detección de la actividad aglutinante y su posterior purificación.
- Se estableció el mejor método de purificación de la lectina, la cual requirió precipitación con sulfato de amonio entre el 50-80%, cromatografía de intercambio iónico con DEAE Sephadex A-50, Cromatografía de afinidad sobre Sepharosa 4B-Glc / Sepharosa 4B-ConA y HPLC en fase reversa.
- La lectina se caracterizó por tener un peso molecular de 29 kDa por SDS PAGE probablemente con subunidades de 15 kDa, un punto isoeléctrico (pI) ácido de 5.7, es glicosilada y reconoció en forma preferencial eritrocitos de tipo B subtipo VI. Su actividad aglutinante fue inhibida únicamente por Glucosa (Glc) y en menor extensión por los disacáridos Trehalosa y Lactosa.
- La lectina se caracterizó por ser activa y estable en un rango de pH de 3.0-7.4 y temperatura entre 4-58°C.

Tabla 6- 1: Lectinas de algas marinas, características bioquímicas y de aislamiento.

| Lectina | Especie | Métodos de purificación | Peso molecular Monómero (kDa) | pI | % Carb. | Especificidad | % (NH ₄) ₂ SO ₄ | Term. (°C) | Rango pH | Eritrocitos | Cationes | Referencia |
|--------------------------------------|--------------------------------|---|-------------------------------|------|---------|---|---|------------|----------|-------------------|-------------|---------------------------|
| UFH | <i>Ulva fasciata</i> | Cromatografía de Intercambio iónico DEAE-celulosa | 14.5 | - | - | No específica | 60-90 | 40-100 | 6.0-10.5 | ABO | NR | (S. Kumar & Barros, 2020) |
| UPL 1 | <i>Ulva pertusa</i> | Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B - Tiroglobulina bovina | 23 | - | 1.2 | Tiroglobulina bovina y N-acetil-D-glucosamina | - | 30-70 | 6.0-8.0 | Conejo | Ca, Mn, Zn. | (S. Wang et al., 2004) |
| TCL | <i>Tichocarpus crinitus</i> | Cromatografía de interacción hidrófoba sobre fenil-Sepharosa y cromatografía de filtración en gel sobre Superdex 75 HR 10/30. | 41 | 4.93 | 6.9 | Mucina de estómago porcino (tipo VII) (PSM) y fetuina | 75 | 20-90 | 5.0-9.0 | ABO, Conejo, Rata | NR | (Molchanova et al., 2010) |
| Lectina de <i>Vidalia obtusiloba</i> | <i>Vidalia obtusiloba</i> | Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y cromatografía de afinidad en goma guar reticulada | 59.6 y 15.2 | - | 43.2 | N-acetil-galactosamina, D-galactosamina, α-lactosa y D-galactosa y por la glicoproteína mucina del estómago porcino | - | 50-70 | - | O | Ca, Mn | (Melo et al., 2004) |
| GOL | <i>Gracilaria ornata</i> | Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa y cromatografía de afinidad sobre mucina-Sepharosa 4B. | 17 | 5.4 | 2.9 | Mucina de estómago porcino, lactotransferrina, asialofetuina y tiroglobulinas bovinas y porcinas. | 70 | 50-90 | - | Conejo, pollo | NR | (Leite et al., 2005) |
| LTC | <i>Tricleocarpa cylindrica</i> | Cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sepharosa, Cromatografía de afinidad sobre ConA-Sepharosa 4B, HPLC | 29* | 5.7 | n.d. | Glucosa, Trehalosa | 50-80 | 58 | 3.0-7.4 | B>O>A | NR | Este estudio |

pI: punto isoeléctrico, Carb.: carbohidratos, N.d.: no determinado, NR: No requiere cationes. Tem.: rango temperatura actividad. *: monómero, probablemente dímero, requiere validación.

6.2 Recomendaciones

Hacer estudios de purificación en forma preparativa para obtener una mayor cantidad de la lectina (LTC) y de esta forma llevar a cabo estudios de estructura, función y actividad biológica de esta proteína.

ANEXOS

A. Clasificación de lectinas por homología y cercanía evolutiva

Tabla A- 1: Clasificación por homología o cercanía evolutiva: Categoría I

| Categoría 1 | |
|-------------|--|
| Tipo B (?) | β prisma, relacionadas con jacalina |
| Tipo C | dependientes de calcio, selectinas, colectinas |
| Tipo E (?) | fucolectinas de anguila |
| Tipo F (?) | ficolinas, dominio fibrinogeno/colágeno |
| Tipo G (?) | lectinas de campanilla o ajo |
| Tipo S | glectinas |
| Tipo H (?) | hialaderinas |
| Tipo I | miembros superfamilia inmunoglobulinas |
| Tipo J (?) | ameba o de unión a quitina |
| Tipo L | leguminosas, ERGIC-53 en el RE-Golgi, calnexinas |
| Tipo M | relacionadas con α -manosidasa |
| Tipo N | nucleotido fosfohidrolasas (LNPs) con dominios de unión a glicanos y apirasa |
| Tipo P | receptoras de manosa 6 fosfato |
| Tipo R | ricina, receptores de GalNAc-SO ₄ |
| Tipo T (?) | taquilectinas del cangrejo herradura |
| Tipo W (?) | dominio heveína |
| Tipo X (?) | huevo de <i>Xenopus</i> |

Adaptado de: (Ajit Varki et al., 2017)

Tabla A- 2: Clasificación por homología o cercanía evolutiva: Categoría II

| Categoría 2 | |
|-------------|--|
| 1 | algunas anexinas |
| 2 | pentraxinas con dominio estructural pentavalente |
| 3 | algunos dominios de laminina G, reconocen glucanos en α -distroglicano |
| 4 | CD11b/CD18 reconocen glicanos de hongos y residuos de GlcNAc |
| 5 | factor de complemento H, reconocen ácido siálico de la pared celular |
| 6 | factor- α de necrosis tumoral, se une a N-glicanos de oligomanosa |
| 7 | Interleuquinas IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, y IL-7 se unen a glicanos variados |
| 8 | anfoterina se uno a N-glicanos carboxilados |

Adaptado de: (Ajit Varki et al., 2017)

B. Muestra de cálculo cuantificación micro-Kjeldahl

Tabla B- 1: Datos para la muestra de cálculo determinación %Proteína total Kjeldahl en la harina utilizada en ETc1.

| | |
|--------------------------------|-------|
| Masa Harina Tratada Total (g) | 5 |
| Masa Harina Determinación (mg) | 51.2 |
| Volumen de Extracto total (ml) | 157.5 |
| Concentración HCl (M) | 0.018 |

I. Determinación del %Nitrógeno total

$$\%N = \frac{(V_m - V_b) \times [HCl] \times 14^*}{m_h} \times 100$$

V_m : Volumen de HCl utilizado en muestra, V_b : Volumen de HCl utilizado en el blanco, m_h : masa de la harina usada en la determinación, *: peso molecular del nitrógeno.

$$\%N = \frac{(2.25 \text{ ml} - 0.10 \text{ ml}) \times [0.018 \text{ mmol/ml}] \times 14 \text{ mg/mmol}^*}{51.2 \text{ mg}} \times 100 = 1.06$$

II. Determinación del %Proteína total

$$\%P = \%N \times 4.59^*$$

*: factor de conversión de nitrógeno a proteínas para algas rojas (Lourenço et al., 2002).

$$\%P = 1.06 \times 4.59 = 4.87$$

Nota: para muestras líquidas se reemplaza m_h con el volumen de la alícuota.

C. Alineamientos de secuencias curadas de algas marinas en Uniprot y Galectina-4 de humano.

Secuencias primarias en formato FASTA de las 6 lectinas de algas rojas curadas en Uniprot y el N-terminal de la Galectina-4 de humano.

>sp|P56470|LEG4_HUMAN Galectin-4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LGALS4 PE=1 SV=1
MAYVPAPGYQPTYNPTLPYYQPIPGGLNVGMSVYIQGVASEHMKRFFVNFVVGQDPGSDVAFHF
NPRFDGWDKVVFNLTQQGKKGWSEERKRSMPPFKKGAAFELVFIVLAEHYKVVVNGNPFYEYGHRL
PLQMVTHLQVDGDLQLQSINFI

>sp|C0HL89.1|LEC1_SOLFI RecName: Full=Lectin SfL-1

GRYTVQNQWGGSSAPWNDAGLWLLGSRANQNVMDVSVTSSDGGATLTGTMTYSGEGPIGFKG
TRRGDSNNYDVENQWGGSSAPWHAGGTFVIGSRSGQGVAVDVNSSDGGKTLTGTMTYANEG
PIGFKGTQSGGDSYNNVENQWGGSSAPWNKAGAWALGDRDGGQVIGVDVTSSDGGKTLTGTMTQ
YQNEGPIGFKGTSTGGSNYKVENQWGGSSAPWNPAGNWLIGDRHNQNIVAVKVTSSDNGKTLG
GTCTYEREGPIGFKGTAI

>sp|C0HL90.1|LEC2_SOLFI RecName: Full=Lectin SfL-2

GRYTVQNQWGGSSAPWNDAGVFLGGRANQNVMAIDVSSSDGGKTLTGTMTYSGEGPIGFKGT
RRGESNNYEVENQWGGSSAPWHPAGTFVIGSRSGQAVVAMNVTSHDGGKTLSGHMTYENEGPI
GFKGTQAEGDYNNVENQWGGSSAPWNKAGVWALGSRASQGVVCLDVSSSDGGKTLTGTMTQY
QNEGPIGFRGTLTGANNYKAENQWGGSSGAWNPAGLWLIGDRHNQNIIGVKVTSDDNGKTLEGT
CTYYREGPIGFKGVAN

>sp|P84331.1|LEC1_EUCSE RecName: Full=Lectin ESA-2

GRYTVQNQWGGSSAPWNDAGLWILGSRGNQNVMAVDVNSSDGGANLNGTMTYSGEGPIGFKG
ARRGESNVYDVENQWGGSSAPWHAGGQFVIGSRSGQVLAVNITSSDGGKTLTGTMTYEREGP
IGFKGTQSGGDTYNNVENQWGGSSAPWNKAGI WALGDRSGQAMIAMDVSSSDGGKTLTGTMTQY
KGEPIGFRGKLSGANNYSVENQWGGSSAPWNAAGDWLIGDRHNQNITAVKVSSDNDGKNLDG
TCTYEREGPIGFKGVATS

>sp|P84871.1|LEC1_HYPMC RecName: Full=Lectin-1; AltName: Full=HCA.

QKFCTLDIAPVCCQIVIGGGMYTAGNACMCEGFVSGVGRNENPKECPCTREAQIPSCSSRWGL
VSVTGKACDCLGGTVAFPEPCSPY

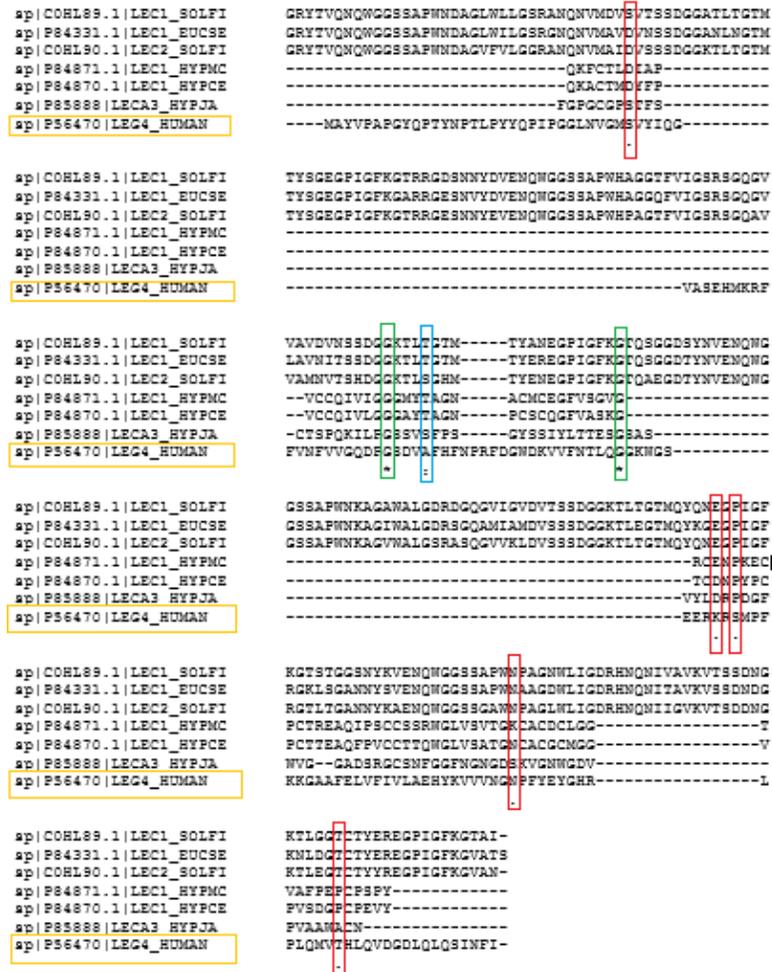
>sp|P84870.1|LEC1_HYPCE RecName: Full=Lectin-1; AltName: Full=HCA.

QKACTMDYFPVCCQIVLGGGAYTAGNPCSCQGFVASKGTCDNPYPCPCTTEAQFPVCCCTTQWG
LVSATGNACGCMGGVPVSDGPCPEVY

>sp|P85888|LECA3_HYPJA Hypnin-A3 OS=Hypnea japonica OX=105606 PE=1 SV=1

FGPGCGPSTFSCSPQKILPGSSVSFSPSGYSSIIYLTTESGSASVYLDRPDGFWGGADSRGCSNF
GGFNGNGDSKVGNGWGDVPVAAWACN

Figura C- 1: Alineamiento de secuencias de algas rojas curadas en Uniprot con el N-terminal de la Galectina-4 de humano usando Clustal W (Matriz BLOSUM62).



En asterisco se señalan los residuos conservados en las siete secuencias, en posición 110 y 135 en el alineamiento se observan con (*) y señaladas en verde dos glicinas conservadas, estas corresponden en la Galectina-4 a las glicinas G57 y G81. Con (:) se indica presencia de alguno de los grupos fuertemente conservados, este se evidencia en la posición 114 del alineamiento en color azul que en la Galectina-4 corresponde a A61 (grupos fuertemente conservados: STA, NEQK, NHQK, NDEQ, QHRK, MILV, MILF, HY, FYW). Con (·) se indica de alguno de los grupos débilmente conservados, se evidencian cinco de estos en posiciones 36, 194, 196, 224 y 256 (colores rojos), para la Galectina-4 corresponden a los residuos S32, K89, S91, N119 T134, respectivamente (grupos débilmente conservados: CSA, ATV, SAG, STNK, STPA, SGND, SNDEQK, NDEQHK, NEQHRK, FVLIM, HYF). En amarillo se señala la posición de la secuencia del N-terminal de la Galectina-4 de humano.

D. Protocolos para el acople de columnas de afinidad.

Protocolo para el acople de columnas de afinidad - CARBOHIDRATOS

En el presente se señalan las etapas necesarias y consideraciones generales para la activación de un soporte de afinidad con carbohidratos usando un soporte de Sepharosa-4B.

ETAPAS:

I. Activación con divinil sulfona (DVS)

- El soporte de Sepharosa 4B se lava inicialmente con >30 ml de agua desionizada o MilliQ posteriormente se equilibra con 30 ml de carbonato de sodio 0.5 M pH 11.
- Se resuspende el gel en 2 ml de carbonato de sodio 0.5 M pH 11 en un falcón de 15 ml, posteriormente se adicional 100 µl de DVS, gota a gota en cabina, el falcón se dispone en un agitador rotatorio, la activación se mantiene en agitación durante dos horas a temperatura ambiente, posteriormente el soporte se lava con >30 ml de agua desionizada o MilliQ.

II. Acoplamiento del carbohidrato

- El soporte lavado se equilibra con 30 ml de carbonato de sodio 0.5 M pH 11 y se resuspende en un falcón con 2 ml de este mismo buffer conteniendo el carbohidrato de interés en una concentración de 0.3 M. Consecutivamente, el falcón con el soporte se dispone en agitador rotatorio por 24 horas.
- Después del tiempo de interacción soporte-carbohidrato se lava el gel con 30 ml de agua desionizada o MilliQ* y 30 ml de carbonato de sodio 0.5 M pH 11. Posteriormente, el soporte se resuspende en 2 ml de carbonato de sodio 0.5 M pH 11 conteniendo 100 µl de β-mercaptoetanol y se dispone en agitador rotatorio por 2 horas a temperatura ambiente.

- Trascurrido el tiempo de interacción con el β -mercaptoetanol se lava el soporte con 100 ml de agua desionizada o MilliQ, 30 ml de NaCl 1.0 M y se equilibra con 30 ml de la solución de elución requerida (en este caso PBS 1X). Finalmente, se empaca en columna y se equilibra.

NOTA: todos los lavados se realizan en embudo sinterizado. (*): Los lavados se recolectan para determinar su concentración y realizar los cálculos de porcentaje de acoplamiento respecto a la cantidad de carbohidrato suministrada inicialmente.

Protocolo para el acople de columnas de afinidad – GLICOPROTEÍNAS

En el presente se señalan las etapas necesarias y consideraciones generales para la activación de un soporte de afinidad con glicoproteínas.

ETAPAS

I. Preparación del medio:

Debido a que la Sepharosa 4B activada con CNBr se encuentra liofilizada con aditivos, estos deben retirarse antes de acoplar el ligando, se deben usar lavados a pH bajo (3.0), este pH preserva la actividad de los grupos reactivos que a pH alto se hidrolizarían.

- Pesar la cantidad requerida de liofilizado respecto a la siguiente relación: 1g de liofilizado para 3.5 ml de volumen final de medio.
- Para columna de 2.0 ml se requiere 0.57g de liofilizado
- La cantidad requerida se debe resuspender en HCl 1mM
- El medio se hinchará al adicionar HCl y deberán hacerse lavados sucesivos con HCl 1mM por 15 minutos, los lavados se realizan en embudo sinterizado.

Nota: Se usan aproximadamente 200ml de HCl 1mM por gramo de liofilizado. Para columna de 2.0ml 120ml aproximadamente.

Reactivos requeridos:

- ✓ HCl 1 mM

II. Acople del ligando

- Disolver el ligando en buffer de acoplamiento, 5 ml de buffer por gramo de liofilizado.

Cantidad de ligando:

Se recomienda usar 5-10mg de proteína por ml de medio

Se recomienda usar 1-10 μ moles para ligandos más pequeños por ml de medio

- Agregue la solución de acoplamiento que contiene el ligando con la suspensión de medio preparada en un recipiente con tapón.
- Rote la mezcla de punta en punta durante 1 hora a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Usar agitación suave, no agitadores magnéticos, preferentemente hacer uso de un agitador rotativo de disco.
- Lave el exceso de ligando con al menos 5 volúmenes de buffer de acoplamiento.
- Se deben bloquear los grupos activos restantes, para esto transfiera el medio a buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 o etanolamina 1 M, pH 8,0. Dejar reposar durante 2 horas.
- Finalmente se deben hacer ciclos de lavado a pH alterno, en cada ciclo para cada buffer se usan al menos 5 volúmenes, el ciclo consiste en lavados con:
 1. Ácido acético 0,1M pH 4,0 conteniendo NaCl 0,5M ó Acetato de sodio 0,1M pH 4,0 conteniendo NaCl 0,5M.
 2. Tris-HCl 0,1M pH 8,0 conteniendo NaCl 0,5M.

Realizar lavados con al menos tres de estos ciclos de pH alterno.

Reactivos requeridos:

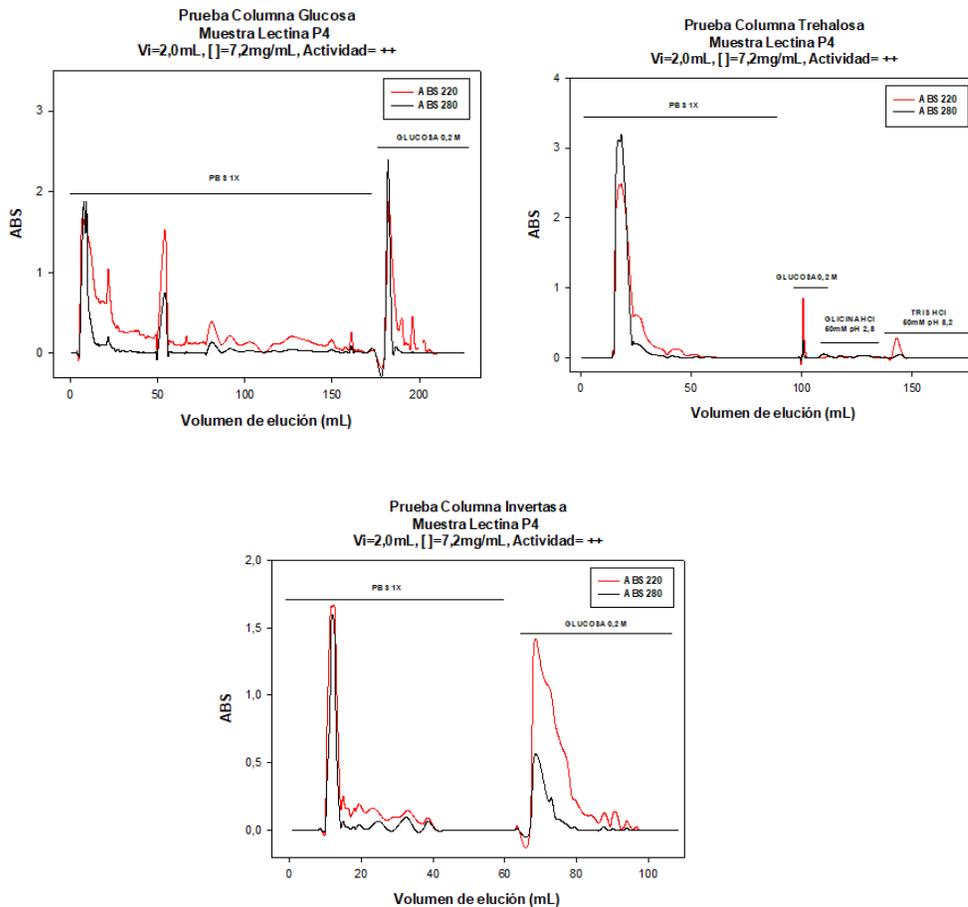
- ✓ Buffer de acoplamiento, Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0,1M pH 8,3 conteniendo NaCl 0,5 M (Para 20mL de buffer: 0,168g NaHCO₃ + 0,5844g NaCl)
- ✓ Buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 ó Etanolamina 1 M pH 8,0 (Para 10mL de buffer: 0.1211g Trizma base + ajustar pH con HCl).
- ✓ Ácido acético 0,1M pH 4,0 conteniendo NaCl 0,5M ó Acetato de sodio 0,1M pH 4,0 conteniendo NaCl 0,5M (Para 50mL de ácido: 286 μ L de Ácido acético 100%w/m + 1.461g de NaCl).
- ✓ Tris-HCl 0,1M pH 8,0 conteniendo NaCl 0,5M (Para 20mL de buffer: 0.2423g Trizma base + ajustar pH con HCl + 0,5844g NaCl).

IMPORTANTE: No desechar ninguno de los lavados, se debe medir ABS a 280nm para identificar la eficacia del acople.

Fuente: CNBr-activated Sepharose TM 4B, Instructions 71-7086-00 AF, GE Healthcare®.

E. Evaluación de acoples de soportes de afinidad con la lectina tipo I de *Dioclea grandiflora*

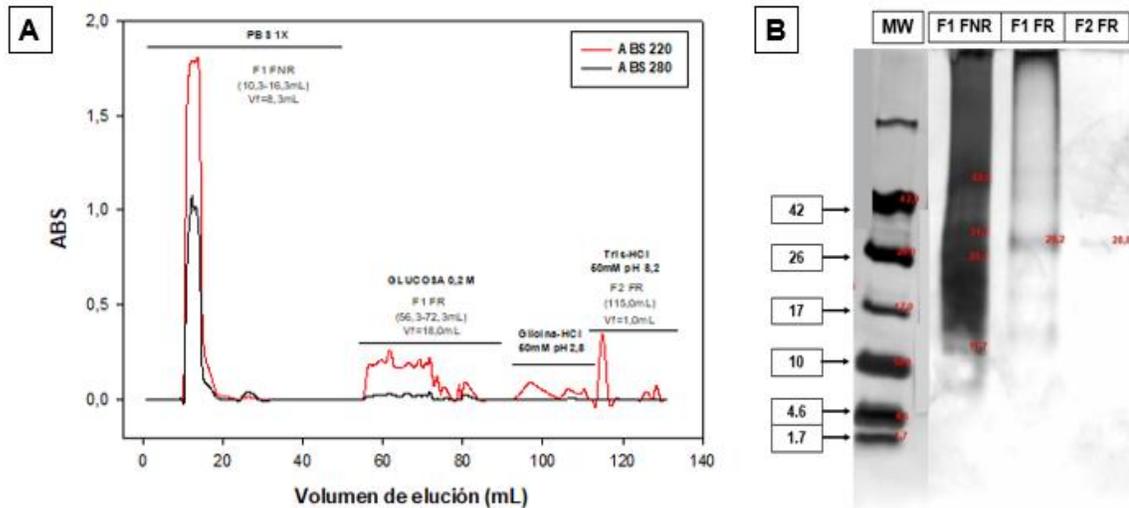
Figura E- 1: Evaluación de soportes para cromatografía de Afinidad- Sepharosa 4-B.



Porcentajes de acoplamiento: Glucosa 93% (de 110 mg se acoplaron 103 mg), Trehalosa 96% (de 205 mg se acoplaron 197 mg), para la invertasa se usaron 30 mg de proteína y se controló la absorbancia de los lavados a 280nm sin presentarse absorbancia por lo que se infiere un acople total de la cantidad usada.

F. Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa – muestra F1 FNR FPLC

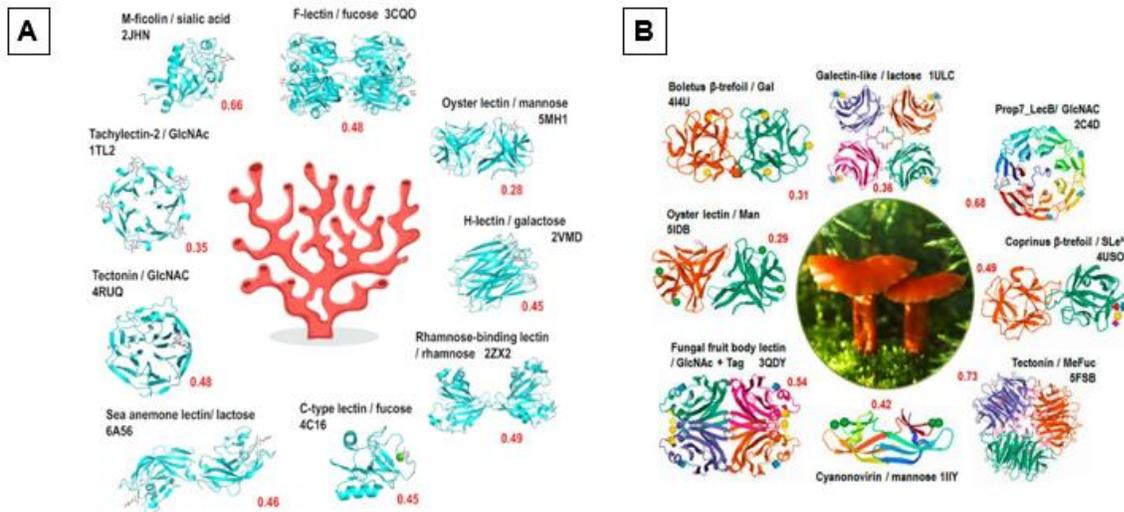
Figura F- 1:Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Invertasa muestra F1 FNR FPLC.



A: perfil cromatográfico muestra sembrada: 4.0 ml de F1 FNR FPLC con concentración 0.80 mg/ml, 3.2 mg de proteína total sembrados, actividad: ++ (eritrocitos O). Volumen de columna 2ml, flujo 0.5 ml/ min. Se recolectaron tres fracciones una no retenida **F1 FNR** (0.54 mg/ml, actividad ++ eritrocitos O), dos retenidas, una eluida con Glucosa 0.2 M **F1 FR** (4.01 mg/ml) y una eluida con Tris HCl 50 mM pH 8.3 **F2 FR**. **B:** SDS PAGE 10% Tris-tricina +Δ -DTT. MW: marcador de peso molecular. 50µg proteína/carril.

G. Lectomas parciales del coral blando *Dendronephthya gigantea* y el hongo *Laccaria bicolor*.

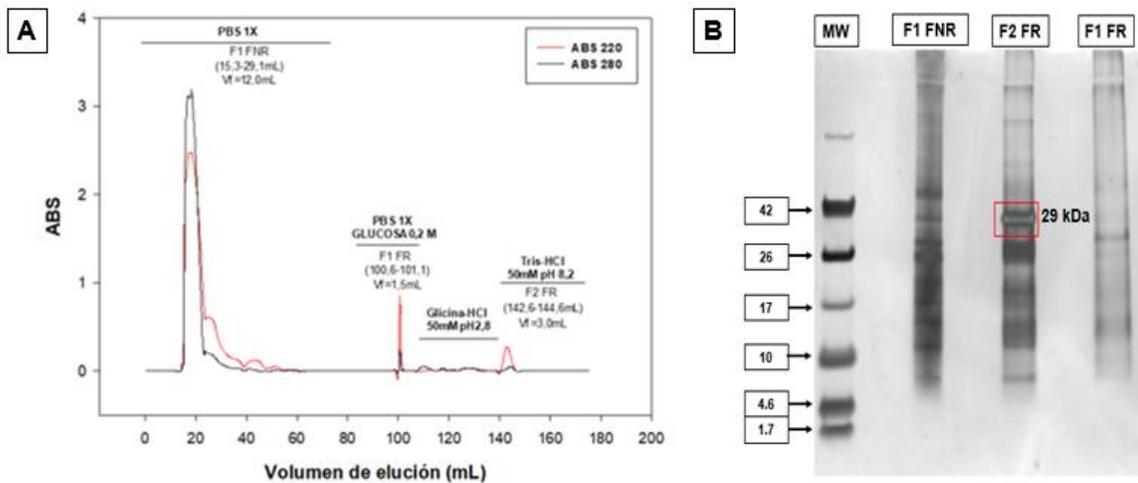
Figura G- 1: Lectomas parciales del coral blando *Dendronephthya gigantea* y el hongo *Laccaria bicolor*.



A: Lectoma de *Dendronephthya gigantea*. **B:** Lectoma de *Laccaria bicolor*. Fuente: (Bonnardel et al., 2021b; Lebreton et al., 2021).

H. Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa – muestra HPLC

Figura H- 1: Cromatografía de afinidad Sepharosa 4B-Trehalosa muestra F1 FNR DEAE-Sepharosa.



A: perfil cromatográfico muestra sembrada: 4.5 ml de F1 FNR DEAE-Sepharosa BATCH con concentración 0.94 mg/ml, 4.23 mg de proteína total sembrados, actividad: +++ (eritrocitos O). Volumen de columna 2ml, flujo 0.5 ml/ min. Se recolectaron tres fracciones, una no retenida **F1 FNR** (1.25 mg/ml, actividad -), dos retenidas, una eluida con Glucosa 0.2 M **F1 FR** (0.14 mg/ml, actividad ++ eritrocitos O) y otra eluida con Tris HCl 50 mM pH 8.3 **F2 FR** (0.10 mg/ml, actividad ++ eritrocitos O). **B:** SDS PAGE 10% Tris-tricina +Δ -DTT. MW: marcador de peso molecular. 50µg proteína/carril. **Nota 1:** teniendo en cuenta los resultados previos de cromatografía de afinidad con el soporte de DEAE-Sepharosa por practicidad se realizó una cromatografía en BATCH para esta etapa. **Nota 2:** como se evidencia en el perfil en F2 FR la banda de interés correspondiente a LTC es predominante por esto dicha fracción se seleccionó para el ensayo con HPLC.

I. Metodología para la determinación del punto isoeléctrico

Para la determinación del punto isoeléctrico (pI) se usó como patrón Ila Protein Mixture® de GE Healthcare de rango pH 3-10, posteriormente con el software ImageLab de Biorad® se estableció el pI correspondiente para LTC. En la **Tabla I- 1** se indica la composición de geles de poliacrilamida para esta determinación.

Tabla I- 1: Composición geles poliacrilamida para la determinación del punto isoeléctrico.

| Componente | mL |
|-------------------------------------|-------|
| Agua desionizada | 8.7 |
| Acilamida (48%)/Bisacrilamida(1.5%) | 2.0 |
| Glicerol | 1.0 |
| Anfolitos | 0.250 |
| Persulfato de amonio 10% | 0.025 |
| TEMED | 0.020 |

A muestras y patrones se adicionó un volumen proporcional 1:1 de buffer carga (glicerol 60%, anfolitos 20%, azul de bromofenol 0.1% en agua desionizada), antes de sembrar las muestras se enfocan los anfolitos durante 30 min a 200V usando soluciones de ácido fosfórico 0.1M en el ánodo y NaOH 0.1M en el cátodo. Posteriormente, se siembran las muestras y se inicia la corrida a 200V a 1.5 horas y 400V 1.5 horas, al finalizar se dispone el gel en TCA 10% por 30 minutos y posteriormente en TCA 1% toda la noche para asegurar el lavado de los anfolitos, finalmente el gel se tiñe usando tinción de plata según los protocolos disponibles en el GRIP.

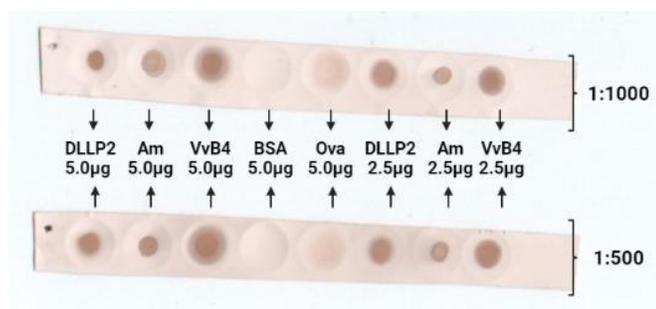
J. Ensayos de glicosilación

DOT-BLOT Directo

Para la detección de interacción de lectinas biotiniladas se realizó un Dot-Blot directo, se sembraron 5µl por punto y en duplicado de cada muestra a evaluar en una membrana de nitrocelulosa, posteriormente se dejó en reposo por 1 hora a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados con PBS-TWEEN 0.1% de 5 min.

Consecutivamente la membrana se sometió a bloqueo toda la noche al adicionar 10mL de PBS-BSA (1.3%), transcurrido el tiempo se lavó con PBS-TWEEN 0.1% por triplicado con lavados de 5 min. La incubación con Avidina peroxidasa se realizó en una proporción de 1/1000 (la proporción se determinó con un DOT-BLOT realizado previamente para evaluar la funcionalidad y sensibilidad del método, **Figura J- 1**) en PBS-BSA (1.3%) durante una hora y se realizaron 5 lavados rápidos con PBS-TWEEN 0.1%. Finalmente, el revelado se realizó con una solución de Diaminobencidina (DAB) 10mg/10mL en PBS 1X pH 7.4 previamente calentada a 37°C por una hora, antes del revelado se adicionan 20µl de H₂O₂ 30%, la reacción se detiene con agua desionizada.

Figura J- 1: DOT-BLOT para identificación de interacción de lectinas biotiniladas.



Incubación con dos proporciones de Avidina:PBS 1X, 1:1000 y 1:500.

Ensayos de Glicosilación

Transferencia de proteínas: Las muestras y patrones se sometieron a electroforesis en geles Tris-Tricina al 10%, estas se sembraron en duplicado (50µg proteína/pozo). Los geles, almohadillas de transferencia y la membrana de nitrocelulosa se equilibraron en buffer de transferencia (Trizma Base 0.76g, Glicina 3.60g, Metanol 100mL, Agua desionizada hasta volumen 250mL) por 30 minutos. Posteriormente, se dispuso el gel sobre la membrana y entre las almohadillas de transferencia, este se cerró y se eliminaron burbujas de aire ejerciendo presión con un cilindro de vidrio cuidadosamente. Las almohadillas se dispusieron en cámara de transferencia, las condiciones para esta transferencia semihúmeda fueron 2V, 120mA y 2W durante 30 minutos ($V \cdot H = 14$).

Teniendo en cuenta que se sembraron las muestras en espejo la membrana se corta a la mitad, una parte se usa para la verificación de la transferencia de las proteínas y la otra para tinción de glicoproteínas. Para la verificación se realiza tinción usando rojo Ponceau (0.5g de Ponceau en 1mL de ácido acético glacial a 100mL de agua), se añade la solución a la membrana y se incuba por 1 minuto, posteriormente, se hacen lavados sucesivos con agua para eliminar el exceso de colorante.

Tinción de glicoproteínas: Una vez se verifica la transferencia la membrana se somete a tinción para glicoproteínas, primero esta se lava con PBS 1X durante 10 minutos, posteriormente la oxidación se realiza con metaperiodato de sodio 30 mM en buffer acetato-acético 100mM pH 5-5.5 durante 2 horas, se realizan 3 lavados con PBS-TWEEN 0.1% durante 10 minutos cada uno, seguidamente la membrana se incuba con Biotina-Hidrazina 1mM en buffer acetato-acético 100mM pH 5-5.5 durante toda la noche, se realizan 3 lavados con PBS-TWEEN 0.1% durante 10 minutos cada uno, posteriormente, la membrana se bloquea con PBS 1X-BSA 1.3% durante una hora y se incuba por una hora con una solución de avidina peroxidasa en proporción 1:1000 en PBS-BSA 1.3%, se realizan 5 lavados rápidos con PBS-TWEEN 0.1% y se adiciona una solución de DAB 10mg/10mL de PBS 1X pH 7.4 previamente calentada a 37°C por una hora, antes del revelado se adicionan 20µl de H₂O₂ 30%, la reacción se detiene con agua desionizada. Como patrones se sembró, albumina de suero bovino, ovoalbúmina e invertasa, todas proteínas glicosiladas, en cantidades de 5µg de proteína total.

Bibliografía

- Alam, T. (2018). Extraction of Natural Colors from Marine Algae. *Journal of Agricultural and Marine Sciences*, 23, 81–91. <https://doi.org/10.24200/jams.vol23iss1pp81-91>
- Alexandre, K. B., Gray, E. S., Lambson, B. E., Moore, P. L., Choge, I. A., Mlisana, K., Karim, S. S. A., McMahon, J., O’Keefe, B., Chikwamba, R., & Morris, L. (2010). Mannose-rich glycosylation patterns on HIV-1 subtype C gp120 and sensitivity to the lectins, Griffithsin, Cyanovirin-N and Scytovirin. *Virology*, 402(1), 187–196. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2010.03.021>
- Alpuche, J., Pereyra, A., Agundis, C., Rosas, C., Pascual, C., Slomianny, M. C., Vázquez, L., & Zenteno, E. (2005). Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1724(1–2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2005.04.014>
- Anam, C., Chasanah, E., Perdhana, B. P., Fajarningsih, N. D., Yusro, N. F., Sari, A. M., Nursiwi, A., Praseptianga, D., & Yunus, A. (2017). Cytotoxicity of Crude Lectins from Red Macroalgae from the Southern Coast of Java Island, Gunung Kidul Regency, Yogyakarta, Indonesia. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 193(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/193/1/012017>
- Barre, A., Damme, E. J. M. V., Simplicien, M., Benoist, H., & Rougé, P. (2020). Man-Specific, GalNAc/T/Tn-Specific and Neu5Ac-Specific Seaweed Lectins as Glycan Probes for the SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronavirus. *Marine Drugs* 2020, Vol. 18, Page 543, 18(11), 543. <https://doi.org/10.3390/MD18110543>
- Barre, A., Simplicien, M., Benoist, H., Van Damme, E. J. M., & Rougé, P. (2019). Mannose-Specific Lectins from Marine Algae: Diverse Structural Scaffolds Associated to Common Virucidal and Anti-Cancer Properties. *Marine Drugs*, 17(8), 440. <https://doi.org/10.3390/md17080440>
- Benevides, N., Holanda, M., Melo, F., Freitas, A., & Sampaio, A. (1998). Purification and Partial Characterisation of the Lectin from the Marine Red Alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Falkenberg. *Botanica Marina*, 41(5), 521–526. <https://doi.org/10.1515/BOTM.1998.41.1-6.521>
- Benevides, N., Holanda, M., Melo, F., Pereira, M., Monteiro, A., & Freitas, A. (2001). Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Green Alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. *Botanica Marina*, 44(1), 17–22. <https://doi.org/10.1515/BOT.2001.003>
- Benevides, N., Leite, A., & Ponte, A. (1996). Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 6(2), 117–122.
- Bitencourt, F. D. S., Figueiredo, J. G., Mota, M. R. L., Bezerra, C. C. R., Silvestre, P. P., Vale, M. R., Nascimento, K. S., Sampaio, A. H., Nagano, C. S., Saker-Sampaio, S., Farias, W. R. L., Cavada, B. S., Assrey, A. M. S., & De Alencar, N. M. N. (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. *Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology*, 377(2), 139–148. <https://doi.org/10.1007/S00210-008-0262-2>
- Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, 6(5), 1–34. <https://doi.org/10.3390/FOODS6050033>
- Bollag, D., & Edelstein, S. (1994). *Protein Methods*. Wiley-Liss. 162-171 p.

- Bonnardel, F., Haslam, S., Dell, A., Feizi, T., Liu, Y., Tajadura, V., Akune, Y., Sykes, L., Bennett, P., MacIntyre, D., Lisacek, F., & Imbert, A. (2021a). Proteome-wide prediction of bacterial carbohydrate-binding proteins as a tool for understanding commensal and pathogen colonisation of the vaginal microbiome. *Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00220-9>
- Bonnardel, F., Mariethoz, J., Pérez, S., Imbert, A., & Lisacek, F. (2021b). LectomeXplore, an update of UniLectin for the discovery of carbohydrate-binding proteins based on a new lectin classification. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D1548. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1019>
- Boonsri, N., Rudtanatip, T., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2016). Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1597–1608. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0969-2>
- Boyd, W. C., Almodóvar, L. R., & Boyd, L. G. (1966). Agglutinins in Marine Algae for Human Erythrocytes. *Transfusion*, 6(1), 82–83. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.1966.tb04699.x>
- Calvete, J. J., Costa, F. H. F., Saker-Sampaio, S., Murciano, M. P. M., Nagano, C. S., Cavada, B. S., Grangeiro, T. B., Ramos, M. V., Bloch, C., Silveira, S. B., Freitas, B. T., & Sampaio, A. H. (2000). The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(2). <https://doi.org/10.1007/PL00000696>
- Carneiro, R. F., Duarte, P. L., Chaves, R. P., da Silva, S. R., Feitosa, R. R., de Sousa, B. L., da Silva Alves, A. W., de Vasconcelos, M. A., da Rocha, B. A. M., Teixeira, E. H., Sampaio, A. H., & Nagano, C. S. (2020). New lectins from *Codium isthmocladum* Vickers show unique amino acid sequence and antibiofilm effect on pathogenic bacteria. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 4263–4276. <https://doi.org/10.1007/S10811-020-02198-X>
- Catanzaro, E., Calcabrini, C., Bishayee, A., & Fimognari, C. (2019). Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. *Marine Drugs*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/MD18010011>
- Chaves, R., da Silva, S., da Silva, J., Carneiro, R., de Sousa, B., Abreu, J. O., de Carvalho, F., Rocha, C., Farias, W., de Sousa, O., Silva, A., Sampaio, A., & Nagano, C. (2018a). *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin family. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2629–2638. <https://doi.org/10.1007/S10811-018-1473-7>
- Chaves, R., da Silva, S., Nascimento, L., Carneiro, R., Silva, A., Sampaio, A., Sousa, B., Cabral, M., Videira, P., Teixeira, E., & Nagano, C. (2018b). Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Pt A), 1320–1329. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.09.116>
- Clausen, H., & Hakomori, S. (1989). ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sanguinis*, 56(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/J.1423-0410.1989.TB03040.X>
- Cortés, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., Aliaga, M., & López-Alarcón, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry*, 608, 113904. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2020.113904>
- Cummings, R. D., Darvill, A. G., Etzler, M. E., & Hahn, M. G. (2017). Glycan-Recognizing Probes as Tools. In *Essentials of Glycobiology* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.048>
- De Coninck, T., & Van Damme, E. (2021). Review: The multiple roles of plant lectins. *Plant Science*, 313, 111096. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2021.111096>
- De Souza, G. A., Ferreira, B. S., Dias, J. M., Queiroz, K. S., Branco, A. T., Bressan, R. E., Oliveira, J. G., & Garcia, A. B. (2003). Accumulation of SALT protein in rice plants as a response to environmental stresses. *Plant Science*, 164(4), 623–628. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00014-1)

Bibliografía

- Delatorre, P., Rocha, B., Gadelha, C., Santi, T., Cajazeiras, J., Souza, E., Nascimento, K., Freire, V., Sampaio, A., Azevedo, W., & Cavada, B. (2006). Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. *Journal of Structural Biology*, *154*(3), 280–286. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2006.03.011>
- Dinh, H. Le, Hori, K., & Quang, N. H. (2008). Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *Journal of Applied Phycology*, *21*(1), 89–97. <https://doi.org/10.1007/S10811-008-9330-8>
- Do Nascimento, L., Carneiro, R., Da Silva, S., Da Silva, B., Arruda, F., Carneiro, V., Do Nascimento, K., Saker, S., Da Silva, V., Porto, A., Cavada, B., Sampaio, A., Teixeira, E., & Nagano, C. (2012). Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. *Marine Drugs*, *10*(9), 1936–1954. <https://doi.org/10.3390/md10091936>
- Domingo, M. (2018). *Caracterización y aplicaciones potenciales de una columna monolítica funcionalizada con magnetita*. Universidad Politécnica de Valencia. Tesis de Pregrado. 52 p.
- Domínguez, A. (2008). *Regulación de la expresión y función de las lectinas mieloides DC-SIGN y LSECtin*. Univesidad Complutense de Madrid, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Tesis Doctoral. 134 p.
- Dumontier, R., Mareck, A., Mati-Baouche, N., Lerouge, P., & Bardor, M. (2018). Toward Future Engineering of the N-Glycosylation Pathways in Microalgae for Optimizing the Production of Biopharmaceuticals. *Microalgal Biotechnology*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.73401>
- Duong, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*, *541*, 85–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Elayabharathi, T., Vinoliya, J., & Bai, S. (2020). Characterization of a novel O-acetyl sialic acid specific lectin from the hemolymph of the marine crab, *Atergatis integerrimus* (Lamarck, 1818). *Fish & Shellfish Immunology*, *106*, 1131–1138. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2020.07.039>
- Elumalai, P., Rubeena, A. S., Arockiaraj, J., Wongpanya, R., Cammarata, M., Ringø, E., & Vaseeharan, B. (2019). The Role of Lectins in Finfish: A Review. *Review in Fisheries Science & Aquaculture*, *27*(2), 152–169. <https://doi.org/10.1080/23308249.2018.1520191>
- Englard, S., & Seifter, S. (1990). Precipitation techniques. *Methods in Enzymology*, *182*(C), 285–300. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82024-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82024-V)
- Fajarningsih, N., Intaqta, N., Praseptianga, D., & Anam, C. (2019). Extraction and Partial Characterization of Lectin from Indonesian Brown Algae *Padina australis* and *Padina minor*. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, *14*, 103–111. <https://doi.org/10.15578/squalen.v14i3.400>
- Figueiredo, J. G., Bitencourt, F. S., Cunha, T. M., Luz, P. B., Nascimento, K. S., Mota, M. R. L., Sampaio, A. H., Cavada, B. S., Cunha, F. Q., & Alencar, N. M. N. (2010). Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: involvement of nitric oxide. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *96*(4), 371–377. <https://doi.org/10.1016/J.PBB.2010.06.008>
- Fontenelle, T. P. C., Lima, G. C., Mesquita, J. X., Lopes, J. L. de S., de Brito, T. V., Vieira Junior, F. das C., Sales, A. B., Aragao, K. S., Souza, M. H. L. P., Barbosa, A. L. D. R., & Freitas, A. L. P. (2018). Lectin obtained from the red seaweed *Bryothamnion triquetrum*: Secondary structure and anti-inflammatory activity in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, *112*, 1122–1130. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.058>
- Fricke, A., Nguyen, X. V., Stuhr, M., Hoang, T. D., Dao, V. H., Tran, M. D., Pham, T. S., Le, H. C., Le, M. H., Pham, Q. L., Schmid, M., Kunzmann, A., Gärdes, A., von Hagen, J., & Teichberg, M. (2021). Subtidal macrophyte diversity and potentials in Nha Trang Bay - baseline data for monitoring a rising natural resource. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *259*, 107460. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107460>
<https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2021.107460>

- Fujii, Y., Gerdol, M., Hasan, I., Koide, Y., Matsuzaki, R., Ikeda, M., Rajia, S., Ogawa, Y., Kawsar, S. M. A., & Ozeki, Y. (2018). Phylogeny and properties of a novel lectin family with β -trefoil folding in mussels. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 30(177), E195–E208. <https://doi.org/10.4052/tigg.1717.1E>
- Fujimoto, Z., Tateno, H., & Hirabayashi, J. (2014). Lectin structures: classification based on the 3-D structures. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1200, 579–606. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_46
- Fukuda, Y., Sugahara, T., Ueno, M., Fukuta, Y., Ochi, Y., Akiyama, K., Miyazaki, T., Masuda, S., Kawakubo, A., & Kato, K. (2006). The anti-tumor effect of *Euchema serra* agglutinin on colon cancer cells in vitro and in vivo. *Anti-Cancer Drugs*, 17(8), 943–947. <https://doi.org/10.1097/O1.cad.0000224458.13651.b4>
- Galland, A. V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J. P., Villaume, C., & Guéant, J. L. (1999). Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (dulse). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(6), 353–359. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(99)00014-5)
- Goldring, J. P. D. (2012). Protein Quantification Methods to Determine Protein Concentration Prior to Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, 869, 29–35. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_3
- Gondim, A. C. S., Roberta Da Silva, S., Mathys, L., Noppen, S., Liekens, S., Holanda Sampaio, A., Nagano, C. S., Renata Costa Rocha, C., Nascimento, K. S., Cavada, B. S., Sadler, P. J., & Balzarini, J. (2019). Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. *MedChemComm*, 10(3), 390–398. <https://doi.org/10.1039/c8md00508g>
- Hammarston, S., & Kabat, E. (1969). Purification and Characterization of a Blood-Group A Reactive Hemagglutinin from the Snail *Helix pomatia* and a Study of Its Combining Site. *Biochemistry*, 8(7), 2696–2705. <https://doi.org/doi:10.1021/bi00835a002>
- Han, J. W., Yoon, K. S., Klochkova, T. A., Hwang, M.-S., & Kim, G. H. (2010). Purification and characterization of a lectin, BPL-3, from the marine green alga *Bryopsis plumosa*. *Journal of Applied Phycology*, 23(4), 745–753. <https://doi.org/10.1007/S10811-010-9575-X>
- Hara, A., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H., & Kiso, M. (2014). A New Chemical Approach to Human ABO Histo-Blood Group Type 2 Antigens. *Molecules*, 19(1), 414. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19010414>
- Hayes, M. (2020). Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods. *Foods*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/FOODS9101340>
- Heljo, V. P., Filipe, V., Romeijn, S., Jiskoot, W., & Juppo, A. M. (2013). Stability of Rituximab in Freeze-Dried Formulations Containing Trehalose or Melibiose Under Different Relative Humidity Atmospheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(2), 401–414. <https://doi.org/10.1002/JPS.23392>
- Hermanson, G., Mallia, A., & Smith, P. (1992). Immobilized affinity ligand techniques. In *Immobilized affinity ligand techniques*. Academic Press. 88-90 p.
- Hichrom. (2018). Chromatography ranges acquired from Grace manufactured by Hichrom in the UK. In *Catálogo Hichrom Limited* (pp. 1–28). Hichrom Limited. www.hichrom.com
- Hidalgo, D. (2017). *Detección, purificación y caracterización parcial de lectinas presentes en algas marinas colombianas*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. Tesis de Maestría, 125 p.
- Hori, K., Matsubara, K., & Miyazawa, K. (2000). Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1474(2), 226–236. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(00)00008-8)
- Hori, K., Miyazawa, K., & Ito, K. (1981). Hemagglutinins in Marine Algae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47(6), 793–798. https://www.jstage.jst.go.jp/article/suisan1932/47/6/47_6_793/_pdf/-char/en

Bibliografia

- Hori, K., Miyazawa, K., & Ito, K. (1990). Some common properties of lectins from marine algae. *Hydrobiologia*, 204–205(1), 561–566. <https://doi.org/10.1007/BF00040287>
- Hori, K., Sato, Y., Ito, K., Fujiwara, Y., Iwamoto, Y., Makino, H., & Kawakubo, A. (2007). Strict specificity for high-mannose type N-glycans and primary structure of a red alga *Eucheuma serra* lectin. *Glycobiology*, 17(5), 479–491. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWM007>
- Huisman, J. (2006). *Algae of Australia: Nemaliales* (1st ed., Vol. 1). CSIRO Publishing. ISBN: 9780643093782. 164 p.
- Hung, L. D., & Trinh, P. T. H. (2020). Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*. *Journal of Natural Medicines* 2020 75:1, 75(1), 223–231. <https://doi.org/10.1007/S11418-020-01455-0>
- Hung, L. D., Sato, Y., & Hori, K. (2011). High-mannose N-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte). *Phytochemistry*, 72(9), 855–861. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2011.03.009>
- Hwang, H. J., Han, J. W., Jeon, H., Cho, K., Kim, J. hee, Lee, D. S., & Han, J. W. (2020). Characterization of a Novel Mannose-Binding Lectin with Antiviral Activities from Red Alga, *Grateloupia chiangii*. *Biomolecules*, 10(2), 333. <https://doi.org/10.3390/BIOM10020333>
- Hwang, H. J., Han, J. W., Jeon, H., & Han, J. W. (2018a). Induction of recombinant lectin expression by an artificially constructed tandem repeat structure: A case study using *Bryopsis plumosa* mannose-binding lectin. *Biomolecules*, 8(4), 146. <https://doi.org/10.3390/biom8040146>
- Hwang, H. J., Han, J. W., Kim, G. H., & Han, J. W. (2018b). Functional expression and characterization of the recombinant n-acetyl-glucosamine/n-acetyl-galactosamine-specific marine algal lectin BPL3. *Marine Drugs*, 16(1), 13. <https://doi.org/10.3390/md16010013>
- Imberty, A. (2011). Synthesis and biological applications of glycoconjugates: Bacterial lectins and adhesins: Structures, Ligands and Functions. In O. Renaudet & N. Spinelli (Eds.), *Synthesis and Biological Applications of Glycoconjugates*, (1), 3–11. Bentham Science Publishers Ltd. <https://doi.org/10.2174/97816080527761110101>
- Ingram, G. (1985). Lectins and lectin-like molecules in lower plants. I. Marine algae (review). *Developmental and Comparative Immunology*, 9(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(85\)90054-0](https://doi.org/10.1016/0145-305X(85)90054-0)
- Jang, H., Lee, D.-H., Kang, H. G., & Lee, S. J. (2020). Concanavalin A targeting N-linked glycans in spike proteins influence viral interactions. *Dalton Transactions*, 49(39), 13538–13543. <https://doi.org/10.1039/D0DT02932G>
- Jiang, S. Y., Ma, Z., & Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1–24. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-79>
- Jung, M. G., Lee, K. P., Choi, H. G., Kang, S. H., Klochkova, T. A., Han, J. W., & Kim, G. H. (2010). Characterization of carbohydrate combining sites of Bryohealin, an algal lectin from *Bryopsis plumosa*. *Journal of Applied Phycology*, 22(6), 793–802. <https://doi.org/10.1007/S10811-010-9521-Y>
- Junkunlo, K., Prachumwat, A., Tangprasittipap, A., Senapin, S., Borwornpinyo, S., Flegel, T., & Sritunyalucksana, K. (2012). A novel lectin domain-containing protein (LvCTLD) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* to yellow head virus (YHV). *Developmental and Comparative Immunology*, 37(3–4), 334–341. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.12.010>
- Kamiya, H., Ogata, K., & Hori, K. (1982). Isolation and Characterization of a New Agglutinin in the Red Alga *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze. *Botanica Marina*, 25(11), 537–540. <https://doi.org/10.1515/BOTM.1982.25.11.537>

- Kamiya, H., Shimomi, K., & Shimizu, Y. (1980). Marine biopolymers with cell specificity--III--Agglutinins in the red alga *Cystoclonium purpureum*: isolation and characterization. *Journal of Natural Products*, 43(1), 136–139. <https://doi.org/10.1021/NP50007A012>
- Kawakubo, A., Makino, H., Ohnishi, J., Hirohara, H., & Hori, K. (1997). The marine red alga *Eucheuma serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. *Journal of Applied Phycology*, 9(4), 331–338. <https://doi.org/10.1023/A:1007915006334>
- Kawakubo, A., Makino, H., Ohnishi, J., Hirohara, H., & Hori, K. (1999). Occurrence of highly yielded lectins homologous within the genus *Eucheuma*. *Journal of Applied Phycology*, 11(2), 149–156. <https://doi.org/10.1023/A:1008062127564>
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R., & Wright, A. D. (2012). Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. *Marine Drugs*, 10(2), 403–416. <https://doi.org/10.3390/MD10020403>
- Kim, G. H., Klochkova, T. A., Yoon, K. S., Song, Y. S., & Lee, K. P. (2006). Purification and characterization of a lectin, bryohealin, involved in the protoplast formation of a marine green alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 42(1), 86–95. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00162.x>
- Klyosov, A., Witczak, Z., Platt, D. (2008). *Galectins*. John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-37318-7. 296 p.
- Kozlowski, L. P. (2017). Proteome-pl: proteome isoelectric point database. *Nucleic Acids Research*, 45(Database issue), D1112. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW978>
- Kumar, K., Reddy, G., Reddy, B., Shekar, P., Sumanthi, J., & Chandra, K. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.4103/0975-8844.99883>
- Kumar, S., & Barros, U. (2020). Purification and Partial Characterization of a Haemagglutinin from *Ulva fasciata*. *Current Science*, 118(4), 621–625. <https://doi.org/10.18520/CS/V118/I4/621-625>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680A0>
- Lambin, J., Demirel Ascı, S., Dubiel, M., Tsaneva, M., Verbeke, I., Wytynck, P., De Zaeytjıd, J., Smagghe, G., Subramanyam, K., & Van Damme, E. J. M. (2020). OsEUL Lectin Gene Expression in Rice: Stress Regulation, Subcellular Localization and Tissue Specificity. *Frontiers in Plant Science*, 11, 185. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00185/BIBTEX>
- Le, H. D., Sato, T., Shibata, H., & Hori, K. (2009). Biochemical comparison of lectins among three different color strains of the red alga *Kappaphycus alvarezii*. *Fisheries Science*, 75(3), 723–730. <https://doi.org/10.1007/s12562-009-0088-y>
- Lebreton, A., Bonnardel, F., Dai, Y. C., Imbert, A., Martin, F. M., & Lisacek, F. (2021). A comprehensive phylogenetic and bioinformatics survey of lectins in the fungal kingdom. *Journal of Fungi*, 7(6), 453. <https://doi.org/10.3390/JOF7060453/S1>
- Leiner, Irvin, Sharon, Nathan, Goldstein, I. (1986). *The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. Elsevier. ISBN: 0124499457 9780124499454. 600 p.
- Leite, Y., Silva, L., Amorim, R., Freire, E., de Melo, D., Grangeiro, T., & Benevides, N. (2005). Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1724(1–2), 137–145. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2005.03.017>
- Liao, J. H., Chien, C. T. H., Wu, H. Y., Huang, K. F., Wang, I., Ho, M. R., Tu, I. F., Lee, I. M., Li, W., Shih, Y. L., Wu, C. Y., Lukyanov, P. A., Hsu, S. T. D., & Wu, S. H. (2016). A Multivalent Marine Lectin from *Crenomytilus grayanus* Possesses Anti-cancer Activity through Recognizing Globotriose Gb3. *Journal of the American Chemical Society*, 138(14), 4787–4795. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00111>

Bibliografía

- Liener, Irvin, Nathan, Sharon, Goldstein, I. (1986). The lectins. *Biochemical Education*, 7(1), 19. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(79\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0307-4412(79)90018-9)
- Lima, M., Carneiro, M., Nascimento, A., Grangeiro, T., Holanda, M., Amorim, R., & Benevides, N. (2005). Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6414–6419. <https://doi.org/10.1021/JF0509660>
- Lindberg, L., Johansson, S., Liu, J., Grufman, P., & Holgersson, J. (2011). Is there a clinical need for a diagnostic test allowing detection of chain type-specific anti-A and anti-B? *Transfusion*, 51(3), 494–503. <https://doi.org/10.1111/J.1537-2995.2010.02870.X>
- Lindberg, L., Theinert, K., Liu, J., & Holgersson, J. (2012). Adsorption of chain type-specific ABO antibodies on Sepharose-linked A and B tetrasaccharides. *Transfusion*, 52(11), 2356–2367. <https://doi.org/10.1111/J.1537-2995.2012.03706.X>
- Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Strategies in 'snake venomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 12. <https://doi.org/10.1186/S40409-017-0117-8>
- Lourenço, S. O., Barbarino, E., De-Paula, J. C., Pereira, L. O. da S., & Marquez, U. M. L. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 50(3), 233–241. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1835.2002.00278.X>
- Lovrien, R., & Matulis, D. (2001). Selective precipitation of proteins. *Current Protocols in Protein Science, Chapter 4*(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0405S07>
- Luo, T., Yang, H., Li, F., Zhang, X., & Xu, X. (2006). Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 30(7), 607–617. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2005.10.004>
- Malini, M., Jansi, M., Margret, M., & Anooj, E. (2019). Characterization of lectin from *Colpomenia sinuosa* and the effect of physicochemical parameters on haemagglutination activity. *A Journal of Composition Theory, XII*(VII), 247–257. ISSN : 0731-6755.
- Mancera, J. E., Pinto, G., & Vilardy, S. (2013). Patrones de distribución estacional de masas de agua en la bahía de Santa Marta, Caribe colombiano: importancia relativa del Upwelling y Outwelling. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 42(2), 329–260. ISSN 0122-9761.
- Marchalonis, J.J., Edelman, J. M. (1968). Isolation and characterization of a hemagglutinin from *Limulus polyphemus*. *Journal of Molecular Biology*, 32(2), 453–465. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90022-3)
- Mathieu, E., Mati, N., Walet, M.-L., Lerouge, P., & Bardor, M. (2020). N- and O-Glycosylation Pathways in the Microalgae Polyphyletic Group. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2027. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.609993>
- Medina, G., Gibbs, R. V., Calvete, J. J., & Carpenter, B. G. (2007). Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum* from the Caribbean Sea. *European Journal of Phycology*, 42(1), 105–112. <https://doi.org/10.1080/09670260601012438>
- Melo, F. R., Benevides, N. M. B., Pereira, M. G., Holanda, M. L., Mendes, F. N. P., Oliveira, S. R. M., Freitas, A. L. P., & Silva, L. M. C. M. (2004). Purification and partial characterisation of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. *Revista Brasileira de Botânica*, 27(2), 263-269. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200006>
- Merck. (2017). Cromolith HPLC columns: Race through separations with revolutionary technology. In *Catálogo Cromolith HPLC columns* (pp. 1–52). Merck. <http://www.supelco.com.tw/B-new-03-chromolith.pdf>

- Mesquita, J. X., de Brito, T. V., Fontenelle, T. P. C., Damasceno, R. O. S., de Souza, M. H. L. P., de Souza Lopes, J. L., Beltramini, L. M., Barbosa, A. L. dos R., & Freitas, A. L. P. (2021). Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, *170*, 532–539. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.12.203>
- Millet, J. K., Séron, K., Labitt, R. N., Danneels, A., Palmer, K. E., Whittaker, G. R., Dubuisson, J., & Belouzard, S. (2016). Middle East respiratory syndrome coronavirus infection is inhibited by griffithsin. *Antiviral Research*, *133*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.07.011>
- Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S. S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. K., & Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*, *134*, 110827. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>
- Mitchell, C. A., Ramessar, K., & O'Keefe, B. R. (2017). Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. *Antiviral Research*, *142*, 37-54. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.03.007>
- Molchanova, V., Chernikov, O., Chikalovets, I., & Lukyanov, P. (2010). Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Tichocarpus crinitus* (Gmelin) Rupr. (Rhodophyta). *Botanica marina*, *53*(1), 69–78. <https://doi.org/10.1515/BOT.2010.001>
- Motohashi, S., Jimbo, M., Naito, T., Suzuki, T., Sakai, R., & Kamiya, H. (2017). Isolation, amino acid sequences, and plausible functions of the galacturonic acid-binding egg lectin of the sea hare *Aplysia kurodai*. *Marine Drugs*, *15*(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/md15060161>
- Moulaei, T., Shenoy, S. R., Giomarelli, B., Thomas, C., McMahon, J. B., Dauter, Z., O'Keefe, B. R., & Wlodawer, A. (2010). Monomerization of Viral Entry Inhibitor Griffithsin Elucidates the Relationship between Multivalent Binding to Carbohydrates and anti-HIV Activity. *Structure*, *18*(9), 1104-1115. <https://doi.org/10.1016/J.STR.2010.05.016>
- Mu, J., Hirayama, M., Sato, Y., Morimoto, K., & Hori, K. (2017). A novel high-mannose specific lectin from the green alga *Halimeda renschii* exhibits a potent anti-influenza virus activity through high-affinity binding to the viral hemagglutinin. *Marine Drugs*, *15*(8), 255. <https://doi.org/10.3390/md15080255>
- Muthana, S., Gulley, J., Hodge, J., Schlom, J., & Gildersleeve, J. (2015). ABO blood type correlates with survival on prostate cancer vaccine therapy. *Oncotarget*, *6*(31), 32244–32256. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4993>
- Nagano, C. (2007). *Estudios estructurales de lectinas de algas marinas y de vegetales superiores*. Universidad de Valencia. Tesis Doctotal, 171 p.
- Nagano, C., Debray, H., Nascimento, K. S., Pinto, V. P. T., Cavada, B. S., Saker-Sampaio, S., Farias, W. R. L., Sampaio, A. H., & Calvete, J. J. (2005a). HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. *Protein Science*, *14*(8), 2167–2176. <https://doi.org/10.1110/PS.051498505>
- Nagano, C., Moreno, F., Bloch Jr, C., Prates, M., Calvete, J., Saker-Sampaio, S., Farias, W., Tavares, T., Nascimento, K., Grangeiro, T., Cavada, B., & Sampaio, A. (2005b). Purification and Characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea Musciformis*. *Protein & Peptide Letters*, *9*(2), 159–165. <https://doi.org/10.2174/0929866023408931>
- Naganuma, T., Hoshino, W., Shikanai, Y., Sato, R., Liu, K., Sato, S., Muramoto, K., Osada, M., Yoshimi, K., & Ogawa, T. (2014). Novel Matrix Proteins of Pteria penguin Pearl Oyster Shell Nacre Homologous to the Jacalin-Related β -Prism Fold Lectins. *PLOS ONE*, *9*(11), e112326. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0112326>
- Nascimento, K., Nagano, C., Nunes, E., Rodrigues, R., Goersch, G., Cavada, B., Calvete, J., Saker, S., Farias, W., & Sampaio, A. (2006). Isolation and characterization of a new agglutinin from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh. *Biochemistry and Cell Biology*, *84*(1), 49–54. <https://doi.org/10.1139/O05-152>

Bibliografía

- Neves, S. A., Freitas, A. L. P., Sousa, B. W., Rocha, M. I. A., Correia, M. V. O., Sampaio, D. A., & Viana, G. S. B. (2007). Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(1), 127–134. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2007000100016>
- Niu, J., Wang, G., Lü, F., Zhou, B., & Peng, G. (2009). Characterization of a new lectin involved in the protoplast regeneration of *Bryopsis hypnoides*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 27(3), 502–512. <https://doi.org/10.1007/s00343-009-9157-4>
- Nizet, V., Varki, A., & Aebi, M. (2017). Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. *Essentials of Glycobiology*. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.037>
- Ogawa, T., Watanabe, M., Naganuma, T., & Muramoto, K. (2011). Diversified Carbohydrate-Binding Lectins from Marine Resources. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1–20. <https://doi.org/10.4061/2011/838914>
- Okuyama, S., Nakamura-Tsuruta, S., Tateno, H., Hirabayashi, J., Matsubara, K., & Hori, K. (2009). Strict binding specificity of small-sized lectins from the red alga *Hypnea japonica* for core (α 1-6) fucosylated N-glycans. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(4), 912–920. <https://doi.org/10.1271/bbb.80881>
- Oliveira, S., Nascimento, A., Lima, M., Leite, Y., & Benevides, N. (2002). Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmel.) Santel & Hommers. *Brazilian Journal of Botany*, 25(4), 397–403. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002012000003>
- Omokawa, Y., Miyazaki, T., Walde, P., Akiyama, K., Sugahara, T., Masuda, S., Inada, A., Ohnishi, Y., Saeki, T., & Kato, K. (2010). In vitro and in vivo anti-tumor effects of novel Span 80 vesicles containing immobilized *Eucheuma serra* agglutinin. *International Journal of Pharmaceutics*, 389(1–2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.033>
- Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2020). Pigments Content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of Different Commercial Dried Algae. *Separations*, 7(2), 33. <https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS7020033>
- Pan, S., Tang, J., & Gu, X. (2010). Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2–4), 154–164. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2009.07.015>
- Parseptiangga, D. (2015). Algal lectins and their potential uses. *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, 10(2), 89–98. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15578/squalen.v10i2.125>
- Pereira, L., & Critchley, A. T. (2020). The COVID 19 novel coronavirus pandemic 2020: seaweeds to the rescue? Why does substantial, supporting research about the antiviral properties of seaweed polysaccharides seem to go unrecognized by the pharmaceutical community in these desperate times? *Journal of Applied Phycology*, 32(3), 1. <https://doi.org/10.1007/S10811-020-02143-Y>
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., Barre, A., & Rougé, P. (2001). Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 491, 27–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1267-7_3
- Pinto, R., de Castro, F., de Santiago-Aguiar, R., & Ponte, M. (2018). Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent. *Algal Research*, 31, 454–462. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.02.021>
- Pinto, V., Debray, H., Dus, D., Teixeira, E., De Oliveira, T., Carneiro, V., Teixeira, A., Filho, G., Nagano, C., Nascimento, K. S., Sampaio, A. H., & Cavada, B. S. (2009). Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma cells. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2009, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2009/862162>
- Pita, R., Anadón, A., & Martínez-Larrañaga, M. R. (2004). Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. *Revista de Toxicología*, 51–63. ISSN: 0212-7113.

- Quintana, J. I., Delgado, S., Núñez-Franco, R., Cañada, F. J., Jiménez-Osés, G., Jiménez-Barbero, J., & Ardá, A. (2021). Galectin-4 N-Terminal Domain: Binding Preferences Toward A and B Antigens With Different Peripheral Core Presentations. *Frontiers in Chemistry*, 9, 664097. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.664097>
- Ramírez, J. S., Franco, A., García, L. M., & López, D. A. (2010). La comunidad fitoplanctónica durante eventos de surgencia y no surgencia, en la zona costera del departamento del magdalena, caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 39(2), 233–263. <https://doi.org/10.25268/BIMC.INVEMAR.2010.39.2.150>
- Ravn, V., & Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 108(1), 1–28. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0463.2000.D01-1.X>
- Rozo, G. (2019). *Algas del Caribe Colombiano: Fuente alternativa de alimentos, nutracéuticos y biomateriales*. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Departamento de Ciencias Biológicas y Ambientales. Tesis Doctoral, 113 p.
- Rüdiger, H. (2008). Structure and Function of Plant Lectins In Glycosciences (Hans, J. & Sigrun, G. eds.). 415–438p. <https://doi.org/10.1002/9783527614738.CH23>
- Sáez, P., Michałowski, T., Navas, M. J., Asuero, A. G., & Wybraniec, S. (2013). An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 43(4), 178–223. <https://doi.org/10.1080/10408347.2012.751786>
- Sampaio, A., Rogers, C., & Barwell, C. (1998b). A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. *Phytochemistry*, 48(5), 765–769. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00966-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00966-7)
- Sampaio, A., Rogers, D., Barwell, C., Saker-Sampaio, S., Costa, F. H., & Ramos, M. (1998a). A new isolation procedure and further characterisation of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. *Journal of Applied Phycology*, 10(6), 539–546. <https://doi.org/10.1023/A:1008061327247>
- Sampaio, A., Rogers, D., Barwell, C., Saker-Sampaio, S., Nascimento, K., Nagano, C., & Farias, W. (2002). New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. *Journal of Applied Phycology*, 14(6), 489–495. <https://doi.org/10.1023/A:1022327010736>
- Sansone, C., & Brunet, C. (2020). Marine Algal Antioxidants. *Antioxidants*, 9(3), 206. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX9030206>
- Sato, Y., Hirayama, M., Morimoto, K., Yamamoto, N., Okuyama, S., & Hori, K. (2011a). High mannose-binding lectin with preference for the cluster of alpha1-2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19446–19458. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.216655>
- Sato, Y., Morimoto, K., Hirayama, M., & Hori, K. (2011b). High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 405(2), 291–296. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.01.031>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schiener, P., Black, K. D., Stanley, M. S., & Green, D. H. (2014). The seasonal variation in the chemical composition of the kelp species *Laminaria digitata*, *Laminaria hyperborea*, *Saccharina latissima* and *Alaria esculenta*. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 363–373. <https://doi.org/10.1007/S10811-014-0327-1>

Bibliografia

- Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S. K., Koča, J., & Rose, A. S. (2021). Mol*Viewer: Modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W431–W437. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB314>
- Sharon, N. (1987). Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Letters*, 217(2), 145–157. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80654-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80654-3)
- Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53–62. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh122>
- Sharon, N., & Lis, H. (2007). Lectins: Second edition. Springer. ISBN: 978-1-4020-6605-4. 454 p.
- Shiomi, K., Kamiya, H., & Shimizu, Y. (1979). Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *agardhiella tenera*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 576(1), 118–127. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90490-2](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90490-2)
- Shiomi, K., Yamanaka, H., & Kichuchi, T. (1980). Biochemical Properties of Hemagglutinins in the Red Alga *Serraticardia maxima*. *The Japanese Society of Fisheries Science*, 46(11), 1369–1373. <https://doi.org/10.2331/SUISAN.46.1369>
- Shiomi, K., Yamanaka, H., & Kikuchi, T. (1981). Purification and Physicochemical Properties of a Hemagglutinin (GVA-1) in the Red Alga *Gracilaria verrucosa*. *J-STAGE*, 47(8), 1079–1084. <https://doi.org/10.2331/SUISAN.47.1079>
- Silva, L., Lima, V., Holanda, M., Pinheiro, P., Rodrigues, J., Lima, M., & Benevides, N. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 33(5), 830–835. <https://doi.org/10.1248/BPB.33.830>
- Silva, S. (2013). *Purificação e caracterização de CiL-2, uma nova lectina isolada da alga marinha verde Codium isthmocladum Vickers*. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca. Tesis de Mestría, 72 p.
- Singh, R. S., Thakur, S. R., & Bansal, P. (2015). Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(1), 77–88. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.798780>
- Singh, R. S., & Walia, A. K. (2018). Lectins from red algae and their biomedical potential. *Journal of Applied Phycology*, 30(3), 1833–1858. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1338-5>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Stepanchenko, N. S., Novikova, G. V., & Moshkov, I. E. (2011). Protein quantification. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(4), 737–742. <https://doi.org/10.1134/S1021443711040182>
- Sun, J., Wang, L., Wang, B., Guo, Z., Liu, M., Jiang, K., Tao, R., & Zhang, G. (2008). Purification and characterization of a natural lectin from the plasma of the shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(3), 290–297. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2008.06.001>
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., Zhao, M., Fu, X., & Wang, L. (2009). Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 146–154. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2008.09.013>
- Swamy, J. M., Sastry, V. M., & Surolia, A. (1985). Prediction and comparison of the secondary structure of legume lectins. *Journal of Biosciences*, 9(3–4), 203–212. <https://doi.org/10.1007/BF02702696>

- Tan, C. H., Tan, K. Y., Yap, M. K. K., & Tan, N. H. (2017). Venomics of *Tropidolaemus wagleri*, the sexually dimorphic temple pit viper: Unveiling a deeply conserved atypical toxin arsenal. *Scientific Reports*, 7, 12. <https://doi.org/10.1038/SREP43237>
- Tasumi, S., Yang, W. J., Usami, T., Tsutsui, S., Ohira, T., Kawazoe, I., Wilder, M. N., Aida, K., & Suzuki, Y. (2004). Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Developmental and Comparative Immunology*, 28(4), 325–335. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2003.08.006>
- Taylor, M. E., Drickamer, K., Schnaar, R. L., Etzler, M. E., & Varki, A. (2017). Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins In *Essentials of Glycobiology (Chapter 27)*. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.028>
- Teixeira, E., Sousa, F., do Nascimento, K., Carneiro, V., Nagano, C., da Silva, B., Sampaio, A., & Cavada, B. (2012). Biological applications of plants and algae lectins: an overview In *Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (C. Chang Ed.) (354 p.). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50632>
- Thompson, M., Owen, L., Wilkinson, K., Wood, R., & Damant, A. (2002). A comparison of the Kjeldahl and Dumas methods for the determination of protein in foods, using data from a proficiency testing scheme. *Analyst*, 127(12), 1666–1668. <https://doi.org/10.1039/B208973B>
- Torres, J. (2010). *Purificación y caracterización parcial de mucina citoplasmática utilizando la lectina de Salvia bogotensis / Partial purification and characterization of cytoplasmatic mucin using the Salvia bogotensis lectin*. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química. Tesis de Maestría, 82 p.
- Tsaneva, M., de Schutter, K., Verstraeten, B., & Van Damme, E. J. M. (2019). Lectin sequence distribution in QTLs from rice (*Oryza sativa*) suggest a role in morphological traits and stress responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020437>
- Tsutsui, S., Komatsu, Y., Sugiura, T., Araki, K., & Nakamura, O. (2011). A unique epidermal mucus lectin identified from catfish (*Silurus asotus*): first evidence of intelectin in fish skin slime. *Journal of Biochemistry*, 150(5), 501–514. <https://doi.org/10.1093/JB/MVR085>
- Van Damme, E. (2021). 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. *Glycoconjugate Journal 2021*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S10719-021-10015-X>
- Vanderlei, E., Patoilo, K., Lima, N., Lima, A., Rodrigues, J., Silva, L., Lima, M., Lima, V., & Benevides, N. (2010). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International Immunopharmacology*, 10(9), 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2010.06.014>
- Varki, A., Etzler, M. E., Cummings, R. D., & Esko, J. D. (2009). Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins. In *Essentials of Glycobiology, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1923/>
- Varki, Ajit, Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., & Seeberger, P. H. (2017). *Essentials of glycobiology, third edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varki, Ajit, & Kornfeld, S. (2017). Historical Background and Overview. In *Essentials of Glycobiology, third edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.001>
- Vasta, G. R., Nita-Lazar, M., Giomarelli, B., Ahmed, H., Du, S., Cammarata, M., Parrinello, N., Bianchet, M. A., & Amzel, L. M. (2011). Structural and functional diversity of the lectin repertoire in teleost fish: Relevance to innate and adaptive immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1388–1399. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2011.08.011>
- Vattuone, M. A., Prado, F. E., Sayago, J. E., & Rodolfo Sampietro, A. (1991). Effect of lectins on Ricinus invertase. *Phytochemistry*, 30(2), 419–422. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83696-I](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83696-I)

Bibliografia

- Verhaest, M., Lammens, W., Le Roy, K., De Coninck, B., De Ranter, C. J., Van Laere, A., Van Den Ende, W., & Rabijns, A. (2006). X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *62*(12), 1555–1563. <https://doi.org/10.1107/S0907444906044489>
- Vimala, T. P. T. V. (2015). Estimation of Pigments from Seaweeds by Using Acetone and DMSO. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, *4*(10), 1850–1854. ISSN: 2319-7064
- Wang, S., Zhong, F., Zhang, Y., Wu, Z., Lin, Q., & Xie, L. (2004). Molecular characterization of a new lectin from the marine alga *Ulva pertusa*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *36*(2), 111–117. <https://doi.org/10.1093/ABBS/36.2.111>
- Wang, X., & Wang, J. (2013). Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental & Comparative Immunology*, *39*(1–2), 27–38. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2012.04.009>
- Wang, Y., Bu, L., Yang, L., Li, H., & Zhang, S. (2016). Identification and functional characterization of fish-egg lectin in zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology*, *52*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2016.03.016>
- Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E., & Brawley, S. H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, *29*(2), 949. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0974-5>
- Widmann, M., Trodler, P., & Pleiss, J. (2010). The Isoelectric Region of Proteins: A Systematic Analysis. *PLoS ONE*, *5*(5), e10546. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0010546>
- Wiltshire, K. H., Boersma, M., Möller, A., & Buhtz, H. (2000). Extraction of pigments and fatty acids from the green alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Aquatic Ecology 2000 34:2*, *34*(2), 119–126. <https://doi.org/10.1023/A:1009911418606>
- Wingfield, P. T. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, *13*(1), A.3F.1-A.3F.8. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA03FS13>
- Wingfield, P. T. (2001). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, APPENDIX 3, Appendix. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA03FS13>
- Wingfield, P. T. (2016). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, *84*(1), A.3F.1-A.3F.9. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA03FS84>
- Wiriyadamrikul, J., Geraldino, P. J. L., Huisman, J. M., Lewmanomont, K., & Boo, S. M. (2019). Molecular diversity of the calcified red algal genus *Tricleocarpa* (Galaxauraceae, Nemaliales) with the description of *T. jejuensis* and *T. natalensis*. *Phycologia*, *52*(4), 338–351. <https://doi.org/https://doi.org/10.2216/13-155.1>
- Wu, M., Tong, C., Wu, Y., Liu, S., & Li, W. (2016). A novel thyroglobulin-binding lectin from the brown alga *Hizikia fusiformis* and its antioxidant activities. *Food Chemistry*, *201*, 7–13. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.01.061>
- Xu, W.-T., Wang, X.-W., Zhang, X.-W., Zhao, X.-F., Yu, X.-Q., & Wang, J.-X. (2010). A new C-type lectin (FcLec5) from the Chinese white shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Amino Acids*, *39*(5), 1227–1239. <https://doi.org/10.1007/S00726-010-0558-7>
- Yang, Y., Zhang, M., Alalawy, A. I., Almutairi, F. M., Al-Duais, M. A., Wang, J., & Salama, E. S. (2021). Identification and characterization of marine seaweeds for biocompounds production. *Environmental Technology and Innovation*, *24*. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101848>
- Yoon, K. S., Lee, K. P., Klochkova, T. A., & Kim, G. H. (2008). Molecular characterization of the lectin, Bryohealin, involved in the protoplast regeneration in the marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, *44*(1), 103–112. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2007.00457.X>

- Zhang, Y., Qiu, L., Song, L., Zhang, H., Zhao, J., Wang, L., Yu, Y., Li, C., Li, F., Xing, K., & Huang, B. (2009). Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(1), 183–192. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2008.03.008>
- Zhao, Z.-Y., Yin, Z.-X., Xu, X.-P., Weng, S.-P., Rao, X.-Y., Dai, Z.-X., Luo, Y.-W., Yang, G., Li, Z.-S., Guan, H.-J., Li, S.-D., Chan, S.-M., Yu, X.-Q., & He, J.-G. (2009). A Novel C-Type Lectin from the Shrimp *Litopenaeus vannamei* Possesses Anti-White Spot Syndrome Virus Activity . *Journal of Virology*, 83(1), 347–356. <https://doi.org/10.1128/JVI.00707-08>
- Zimba, P. V. (2012). An improved phycobilin extraction method. *Harmful Algae*, 17, 35–39. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2012.02.009>
- Ziółkowska, N. E., Shenoy, S. R., O'Keefe, B. R., & Wlodawer, A. (2007). Crystallographic studies of the complexes of antiviral protein griffithsin with glucose and N-acetylglucosamine. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 16(7), 1485. <https://doi.org/10.1110/PS.072889407>