

ESTUDIOS ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE UNA LECTINA AISLADA DE SEMILLAS DE *CAESALPINIA SPINOSA* KUNTZE (TARA)

STRUCTURE AND FUNCTION STUDIES OF A LECTIN FROM *CAESALPINIA* *SPINOSA* KUNTZE (TARA) SEEDS

Werner Mendoza¹; Laura Gandolfo²; Luis Ponce^{3*}; José Novello³; Sergio Marangoni³

RESUMEN

Una lectina de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Tara; Caesalpinaceae, Leguminosae) fue purificada y caracterizada a través de extracción salina, por combinación de dos cromatografías de exclusión molecular y HPLC de fase reversa. El análisis en SDS-PAGE demostró que la lectina purificada era homogénea ya que ésta presentó una sola banda de proteína correspondiente a un tamaño molecular de 29 kDa. La lectina de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (CsLEC) fue capaz de aglutinar eritrocitos del grupo sanguíneo humano "B" Rh+ con una CMH de 3,86 µg/ml y esta actividad fue inhibida por D-glucosa, D-manosa, D-maltosa, D-glucosamina, N-acetil glucosamina (3,25 mM) y el agente quelante EDTA (0,31 mM), lo que sugiere que puede ser considerada como una lectina tipo C que depende de iones divalentes como calcio y manganeso. El análisis completo de aminoácidos reveló que CsLEC es ácida y sumamente hidrofóbica (16,3% residuos ácidos, 8,9% básicos, 17,0% neutros y 57,8% residuos hidrofóbicos), prevaleciendo la fenilalanina (Phe, 22,1%). Comparación de la secuencia aminoacídica con otras secuencias de vegetales determinó que CsLEC tiene homología con lectinas de la familia Leguminosae, mostrando una semejanza del 67,9% con la leucoaglutinina de *Maackia amurensis* (Fabaceae, Papilionoideae) con sialilactosa y el precursor de la lectina de *Maackia amurensis*.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa* Kuntze, lectina, fitohemaglutinina, defensa de la planta.

ABSTRACT

A lectin from *Caesalpinia spinosa* Kuntze (tara; Caesalpinaceae, Leguminosae) seeds was purified and characterized through saline extraction by the combination of two size-exclusion chromatographies and a reverse phase HPLC. The SDS-PAGE analysis demonstrated that the purified lectin was homogeneous since it presented a single protein band corresponding to a molecular size of 29 kDa. The lectin from *Caesalpinia spinosa* Kuntze (CsLEC) was able to agglutinate human blood group "B" Rh+ erythrocytes with a CMH of 3.86 µg/ml. This activity was inhibited by D-glucose, D-maltose, D-mannose, D-glucosamine, N-acetyl glucosamine (3.25 mM) and the chelating agent EDTA (0.31 mM), suggesting that it can be considered as a type C lectin, which depend on divalent ions such as calcium or manganese. The complete amino acid analysis revealed that the CsLEC is acidic and highly hydrophobic (16.3 % acid, 8.9 % basic, 17.0 % neutral and 57.8 % hydrophobic residues), prevailing phenylalanin (Phe, 22.1 %). Amino acid sequence comparison with other plant lectins determined that it has more homology with the lectins from the Leguminosae family, showing 67.9 % similarity with the leucoagglutinin from *Maackia amurensis* (Fabaceae, Papilionoideae) with sialyllactose and the predecessor of the lectin from *Maackia amurensis*.

Key words: *Caesalpinia spinosa* Kuntze, lectin, phytohemagglutinin, plant defense.

¹ Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Escuela de Postgrado, Universidad de San Agustín, Arequipa, Perú. E-mail: wermen2005@peru.com

² Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna, Perú. E-mail: yesminn@hotmail.com

³ Laboratory of Chemistry of Proteins, Department of Biochemistry, University State of Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author: E-mail: poncesoto@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

Las lectinas son proteínas capaces de unir moléculas de azúcar y son ubicuas en organismos vivos. El término lectina, propuesto por Boy y Sharpleigh en 1954, deriva del latín *legere* (seleccionado, escogido) y se refiere a la capacidad de unión selectiva de azúcares particulares. Este término fue generalizado desde 1972 para todas aquellas proteínas ligadoras de azúcares y aglutinadoras de células que no poseen un origen inmune y son encontradas en animales, vegetales y microorganismos (Sharon y Lis, 1989). Las semillas de leguminosas son particularmente fuentes ricas de lectinas (Carlini y Grossi-de-Sá, 2002).

En los vegetales, la mayoría de las lectinas se encuentran en órganos de reserva, lo cual es una evidencia indirecta de su papel como proteínas de defensa. Aún después del descubrimiento de las lectinas, los científicos han estado intrigados por sus posibles papeles biológicos. Un avance se presentó cuando se comprendió que la mayoría de las lectinas vegetales no sólo cumplen un papel en la misma planta, por ejemplo, como una fuente de nitrógeno o como un factor de reconocimiento específico, sino que también interactuarían con glucoconjugados de otros organismos (Peumans y Van Damme, 1995). Las lectinas presentan actividad antiviral, antibacteriana, antifúngica, insecticida y antitumoral (Hudak *et al.*, 2000; Ayouba *et al.*, 1994; Peumans y Van Damme, 1995; Zhu *et al.*, 1993; Castillo-Villanueva y Abdullaev, 2005).

El presente trabajo tiene por objetivo hacer una descripción de la estructura y función de una lectina aislada a partir de semillas de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Tara), pues esta especie además de ser endémica del Perú presenta pocos problemas con plagas, lo cual indicaría el papel de las lectinas en su mecanismo de defensa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: Semillas de tara, *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Caesalpinaceae, Leguminosae), que fueron recolectadas de la localidad de Pachia, Provincia de Tacna (16° 44' 0" latitud sur y entre 70° 16' 0" y 71° 8' 16" longitud oeste).

Extracción salina: De acuerdo al método de Villarrubia *et al.* (1995), 100 g de semillas enteras fueron trituradas en un molino de maíz hasta la ob-

tención de un material pulverizado, de los cuales 70 g de harina fueron disueltos en 210 ml (proporción 1:3 v/v) de una solución de NaCl 10% dentro de un vaso de 500 ml. La mezcla resultante fue mantenida en agitación por 1 hora a temperatura ambiente, para obtener la solubilización de las proteínas. Posteriormente la suspensión obtenida fue filtrada en gasa, a fin de retirar las partículas grandes y materiales insolubles, y centrifugada a 3.000 x g por 20 minutos a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante obtenido (120 ml) fue dializado en 1 litro de tampón bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) 0,1 M, pH 8,0, por 6 horas (realizándose cambios cada 2 horas) con la ayuda de un agitador magnético. La eliminación de sal fue comprobada añadiendo gotas de nitrato de plata (AgNO₃) 0,01 N (de haber presencia de NaCl, la solución adquiriría una coloración lechosa). Dos alícuotas de 0,1 ml fueron tomadas para la determinación de proteínas por el método de Biuret y la prueba de hemaglutinación con eritrocitos humanos. El dializado fue conservado a 4 °C.

Cromatografía de exclusión molecular: Para la purificación de la muestra anterior se colocó 25 ml en una columna de exclusión molecular empacada con Sephadex G-100 (1,6 x 100 cm) según Toyama *et al.* (2001). Luego, 126 ml de la muestra anterior fueron pasados por una columna de Sephadex G-75 (1,9 x 102 cm) según Toyama *et al.*, 2001.

HPLC de fase reversa: 20 mg de fracción con actividad hemaglutinante y de afinidad por carbohidratos de la etapa anterior fue purificada en una columna preparativa μ -Bondapak C18 (0,78 x 30 cm), previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0,1%, pH 3,5 (Tampón A), acoplada a un sistema de HPLC de fase reversa, según Freire *et al.* (2001). El sistema cromatográfico empleado fue el HPLC-PDA 991 (Waters) equipado con dos bombas modelo 510/B (Waters) y un inyector automático de muestras U6K con un asa de 2,0 ml de capacidad. Inicialmente la elusión de la muestra fue realizada a través de un gradiente lineal (0-100%) con acetonitrilo 66% (v/v) (Tampón B). Las fracciones fueron monitoreadas a 280 nm.

Electroforesis SDS-PAGE: La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). Para la determinación de la masa molecular de la fracción con actividad hemaglutinante (CsLEC) se usó el programa Origin 6.0 (CA, USA)

Prueba de hemaglutinación: La actividad hemaglutinante de la lectina fue ensayada según lo descrito por Costa *et al.* (1999) en eritrocitos intactos y sobre eritrocitos tripsinizados de humano de los grupos sanguíneos del sistema ABO, todos factor Rhesus positivo (Rh⁺). La sangre fue recolectada y mantenida en una solución de Alsever (2,05% glucosa, 0,80% citrato de sodio y 0,42% NaCl, pH 6,1 ajustado con ácido cítrico) a 4 °C hasta su uso.

Actividad hemaglutinante: Se realizó según lo descrito por Carvalho *et al.* (1998). Para la determinación de la actividad hemaglutinante de la lectina de tara fueron empleadas placas de microtitulación de 96 pozos (Sigma Chemical Co., USA.). En cada pozo de las primeras filas se adicionaron 50 µl de CTBS e inmediatamente después 50 µl de la lectina. La muestra fue diluida seriadamente, con agitación y transferencia de 50 µl para el pozo siguiente hasta la penúltima fila. Los primeros pozos sin muestra pero con eritrocitos sirvieron como controles. Terminadas las diluciones, se agregaron 50 µl de la suspensión de eritrocitos al 3% (v/v) y las lecturas se realizaron después de 2 horas de incubación de la placa a temperatura ambiente. La inhibición de la actividad hemaglutinante por diversos carbohidratos fue realizada con D-glucosa, D-maltosa, D-manosa, D-glucosamina, N-acetil glucosamina, D-galactosa, sacarosa, D-sorbitol y trealosa. Todos estos reactivos fueron adquiridos de Sigma Co., U.S.A. En las placas de microtitulación (96 pozos, Sigma Co., U.S.A.) se adicionaron a los primeros pozos de las filas 25 µl de carbohidrato a concentraciones que varían desde 50 a 0,05 mM en CTBS. Estos fueron diluidos serialmente con 25 µl de CTBS ya presentes en los pozos hasta alcanzar una concentración final de 3,86 µg/ml. Las placas se mantuvieron en reposo por 5 minutos, para enseguida adicionárseles 50 µl de una suspensión al 3% (v/v) de eritrocitos tripsinizados del grupo O. Después de 2 horas en reposo a temperatura ambiente, se determinó la menor concentración de carbohidrato capaz de inhibir la aglutinación inducida por 3,86 µg/ml de lectina sobre eritrocitos tripsinizados del grupo O Rh⁺. Asimismo, se usaron los agentes quelantes EDTA (ácido etilendiamino tetraacético) y EGTA (ácido etilenglicol bis tetraacético; Sigma Co., USA) para ensayos de inhibición. En cada pocillo de prueba se agregaron 25 µl de TBS más 25 µl del respectivo agente quelante, y se hizo una dilución seriada en la misma fila hasta obtener concentraciones que variaron desde 50 hasta 0,10 mM. Se determinó la menor

concentración de agente quelante capaz de inhibir la aglutinación inducida por 3,86 µg/ml de lectina sobre eritrocitos tripsinizados del grupo O.

Análisis de la secuencia aminoacídica: El análisis de aminoácidos fue realizado en un analizador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters), donde la identificación de los aminoácidos fue realizada a través de una cromatografía en HPLC del producto feniltiocarbamil del aminoácido proveniente de la derivatización con fenilisotiocianato de los aminoácidos que se obtengan por hidrólisis ácida. Esta forma de cromóforos pudo ser detectada en concentraciones de 1 pmol, según la metodología descrita por Henrikson y Meredith (1984). Para la determinación de la secuencia N-terminal (según Edman & Begg, 1967), 40 nmoles de la muestra reducida con 1 M de DTT obtenida en la cromatografía de fase reversa en HPLC fueron colocados en el secuenciador automático modelo 477 (Applied Biosystems). La secuencia N-terminal de la fracción fue comparada con la secuencia de otras lectinas usando el servidor electrónico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> que también brinda acceso directo a bases de datos de proteínas como SWISS-PROT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PURIFICACIÓN DE LA LECTINA DE TARA CSLEC

El perfil cromatográfico resultante de la primera columna de exclusión molecular (Figura 1) muestra la presencia de 2 picos proteicos, siendo el pico 2 el único que mostró actividad hemaglutinante. El perfil cromatográfico de la segunda columna de exclusión molecular (Figura 2) también resultó en la presencia de 2 picos: 2-1 y 2-2, siendo el pico 2-2 el único con actividad hemaglutinante, pese a encontrarse en menor concentración.

Después de cargar esta fracción a una columna de HPLC de fase reversa, se obtuvieron tres picos denominados 2-2A, 2-2B y 2-2C (Figura 3). De éstos, el pico 2-2C fue el único que presentó actividad hemaglutinante, lo que sugiere que correspondería a la lectina altamente purificada. Esta señal de la lectina eluyó a los 37 minutos con una concentración de 58% del tampón B, mientras que las señales menores eluyeron en tiempos anteriores y en menores concentraciones del tampón B. Este resultado sugiere que la lectina tendría un mayor

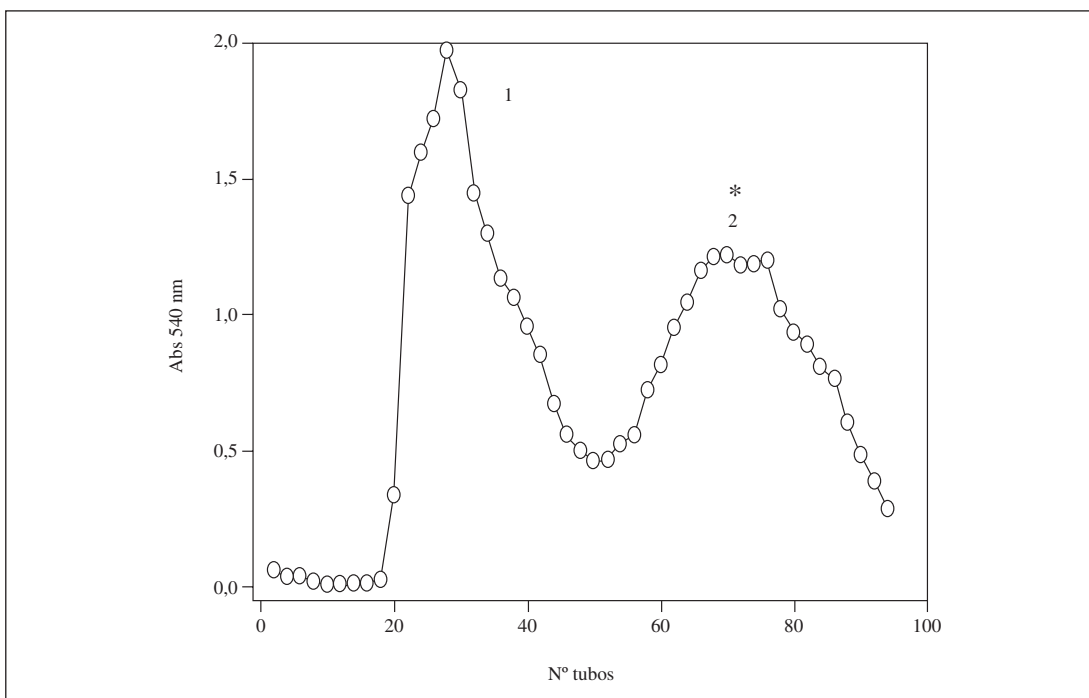


Figura 1. Cromatografía de exclusión molecular del extracto salino de semillas de *C. spinosa* en Sephadex G-100. Se colectaron fracciones de 3 ml/tubo. La absorbancia de las fracciones fue monitoreada a 540 nm. El pico 2 (*) fue el único de los picos que presentó actividad hemaglutinante.

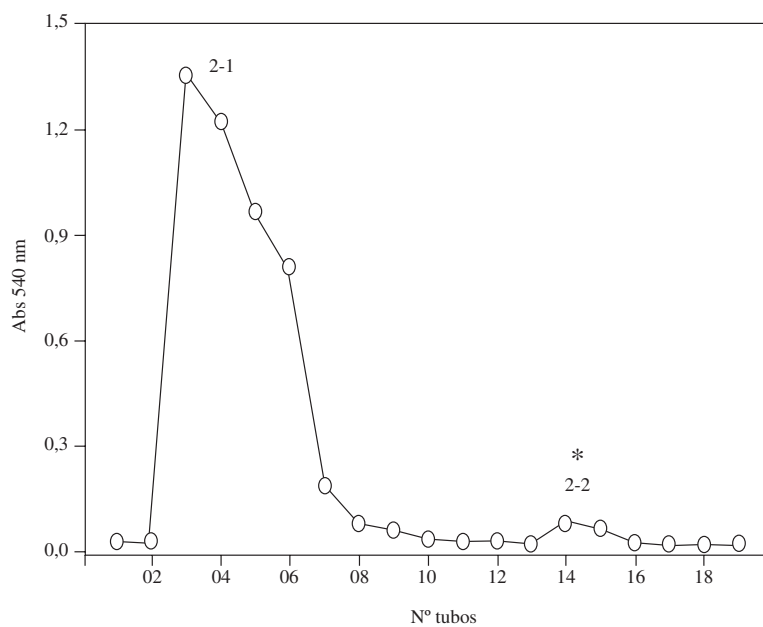


Figura 2. Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 correspondiente al pico 2 de la etapa de purificación anterior, procedente del extracto de semillas de *C. spinosa*. Se colectaron fracciones de 3 ml/tubo y la absorbancia fue monitoreada a 540 nm. El pico 2-2 fue el único que presentó actividad hemaglutinante.

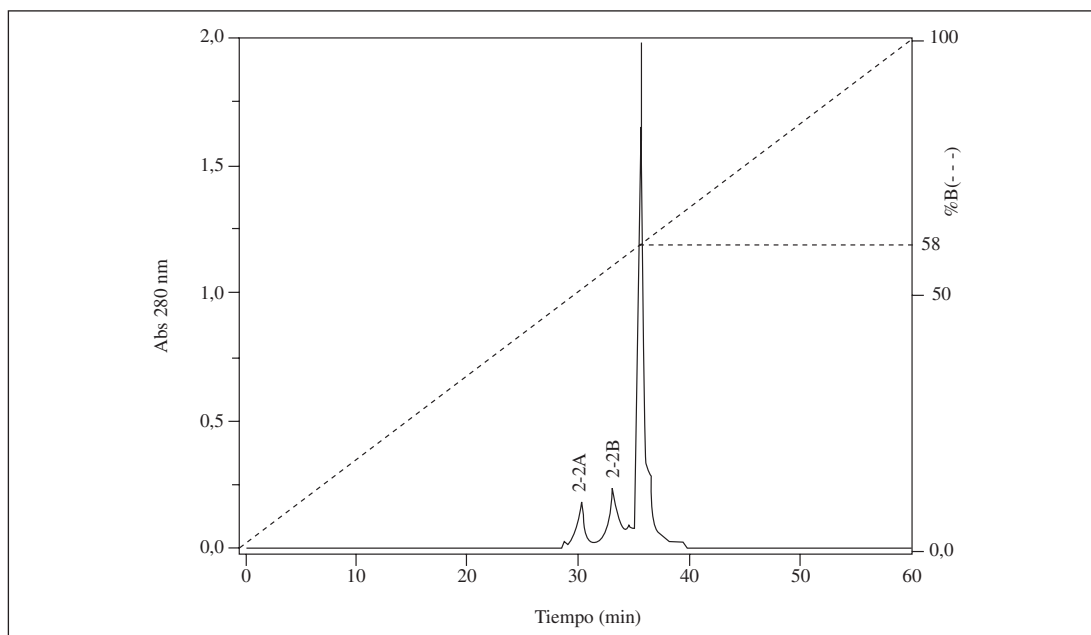


Figura 3. Purificación de CsLEC por HPLC de fase reversa. 5 mg de la fracción 2-2 de la segunda columna de exclusión molecular fueron inyectados a la columna. El monitoreo de la corrida se realizó a 280 nm, siendo las fracciones colectadas a un flujo constante de 1ml/min. La fracción con actividad hemaglutinante corresponde a 2-2 C.

porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos en relación a los dos anteriores, lo que al parecer indicaría que se trata de una proteína altamente compacta y estable.

Para corroborar la naturaleza proteica y la masa de la lectina purificada, la fracción 2-2 C proveniente de la purificación en HPLC de fase reversa fue cargada en un gel denaturante de poliacrilamida. El análisis por SDS-PAGE evidencia que se trata de una proteína de bajo peso molecular, de aproximadamente 29 KDa (Figura 4). Asimismo, se puede apreciar la homogeneidad y pureza de la lectina obtenida, al no encontrarse otras bandas en relación al extracto crudo (EC).

A su vez, como se puede apreciar en la Figura 5, se determinó la masa molecular de la fracción con actividad hemaglutinante correspondiente a CsLEC, a través de una regresión semilogarítmica haciendo uso del programa para PC Origin 6.0, indicando que la lectina obtenida posee una masa molecular de ~29,19 KDa.

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LA CSLEC

Como se puede apreciar en la Tabla 1, se practicaron diluciones seriadas de la fracción 2-2 C

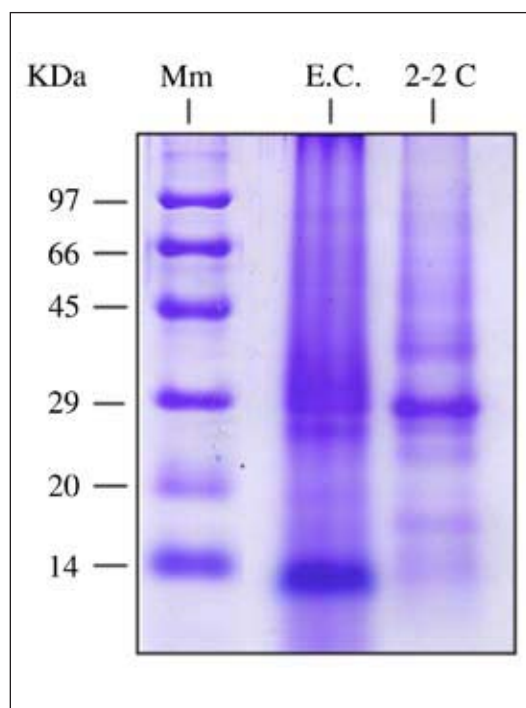


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5%) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). E.C. = extracto crudo de semillas de *C. spinosa*, 2-2 C = fracción con actividad hemaglutinante procedente de la purificación en HPLC de fase reversa. Mm, marcadores de masa molecular.

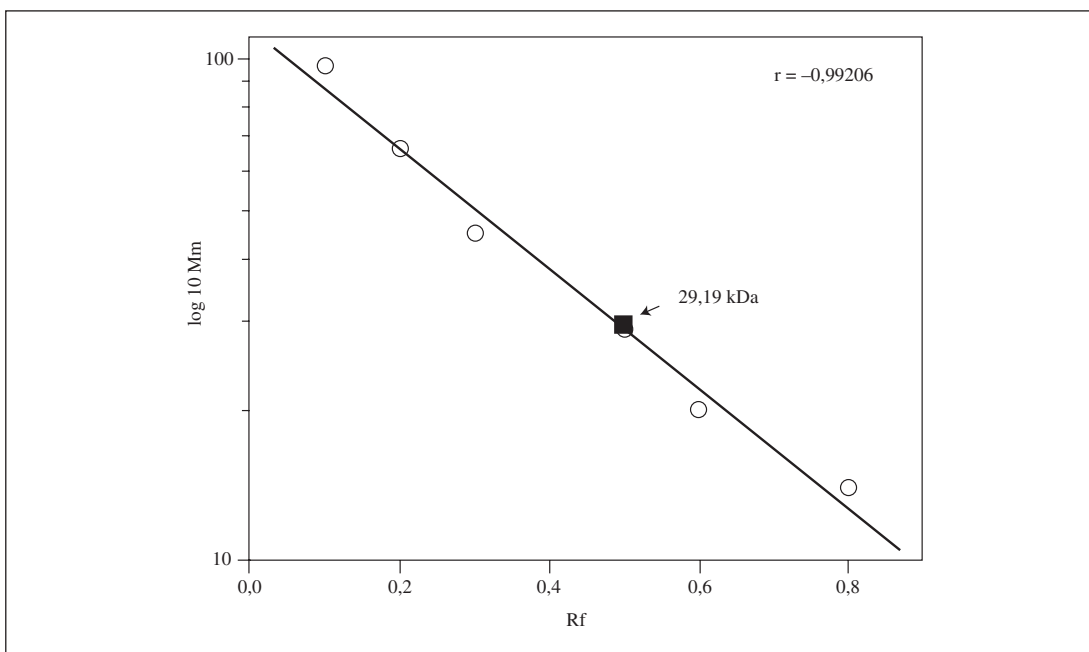


Figura 5. Determinación de la masa molecular relativa de la fracción hemaglutinante 2-2 C (CsLEC), procedente de semillas de *Caesalpinia spinosa* (33,38 kDa). Log₁₀ Mm = logaritmo de base 10 de los marcadores de masa molecular en kilodaltons; Rf = distancia migrada de los marcadores entre la distancia total del gel; r = coeficiente de regresión y correlación inversa.

(CsLEC), las que fluctuaron desde 247 hasta 0,24 $\mu\text{g/ml}$ para determinar la concentración mínima hemaglutinante (CMH) (Figura 6), la cual fue detectada hasta el pozo donde se observaba una película uniforme de eritrocitos. Se pudo determinar que la CMH para los eritrocitos del grupo O⁺ fue de 7,73 $\mu\text{g/ml}$, para el grupo A de 7,73 $\mu\text{g/ml}$, para el grupo B de 3,86 $\mu\text{g/ml}$, y para el grupo AB de 15,46 $\mu\text{g/ml}$ de CsLEC.

De acuerdo con la Tabla 1, la actividad hemaglutinante de la CsLEC (con una concentración mínima de 3,86 $\mu\text{g/ml}$) frente a los eritrocitos humanos del grupo B Rh⁺ fue inhibida por los azúcares: D-glucosa, D-maltosa, D-manosa, D-glucosamina y N-acetil glucosamina, todos a una concentración de 3,25 mM y requirió una mayor concentración de otros azúcares tales como: D-galactosa, sacarosa, D-sorbitol y trealosa (12,5 mM), tal como se indica en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se observa que la hemaglutinación inducida por CsLEC (3,86 $\mu\text{g/ml}$) sobre eritrocitos del grupo sanguíneo B Rh⁺ es específicamente inhibida por EDTA (0,31 mM) y en una proporción ligeramente menor que el EGTA (0,63 mM), lo cual indica que la CsLEC es una lectina tipo C,

ya que en presencia de estos agentes quelantes pierde su actividad aglutinante. Esto concuerda con la necesidad que tienen, por ejemplo, las lectinas de leguminosas de requerir iones para poder ligarse a carbohidratos. Iones divalentes como el calcio y manganeso se encargarían de mantener la estructura tridimensional de estas proteínas con sus sitios reactivos altamente conservados, los cuales están localizados en una de las dos asas del sitio de ligamiento de carbohidratos.

Tabla 1
Hemaglutinación inducida por CsLEC en eritrocitos humanos

Grupo sanguíneo humano	Concentración mínima hemaglutinante ($\mu\text{g/ml}$)
AB	15,46
A	7,73
B	3,86
O	7,73

Tabla 2

Inhibición de la actividad hemaglutinante de la fracción 2-2 C (CsLEC) por carbohidratos

Carbohidrato	Concentración mínima inhibitoria (mM)
D-Glucosa	3,25
D-Maltosa	3,25
D-Manosa	3,25
D-Glucosamina	3,25
N-acetilglucosamina	3,25
D-Galactosa	12,5
Sacarosa	12,5
D-sorbitol	12,5
Trealosa	12,5

Tabla 3

Inhibición de la actividad hemaglutinante de la CsLEC por agentes quelantes y DTT

Agente Inhibidor	Concentración mínima inhibitoria (mM)
EDTA	0,31
EGTA	0,63
DTT	n.i.

ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE CSLEC

La lectina CsLEC fue sometida a hidrólisis ácida (HCl 6N) y a derivatización por PITC para obtener la composición global de aminoácidos (Tabla 4), donde los de naturaleza ácida constituyen

Tabla 4

Composición de aminoácidos de la CsLEC. Donde m aa, es mol de aminoácido; masa molecular de aminoácido por proteína; % porcentaje

Naturaleza	Tipo	Sigla	Razón Molar Aa./Prot.	%	Masa aa/Mol proteína
Ácido	Asp	D	23	9,4	2.647,00
Ácido	Glu	E	17	6,9	2.195,21
Polar s/c	Ser	S	16	6,5	1.393,44
Hidrofóbico	Gly	G	15	6,1	856,05
Básico	His	H	3	1,2	411,48
Básico	Arg	R	12	4,9	1.874,52
Polar s/c	Thr	T	18	7,3	2.000,16
Hidrofóbico	Ala	A	10	4,0	710,90
Hidrofóbico	Pro	P	21	8,6	2.039,73
Polar s/c	Tyr	Y	2	0,8	228,30
Hidrofóbico	Val	V	11	4,5	1.794,65
Hidrofóbico	Met	M	2	0,8	262,48
Polar s/c	Cys	C	6	2,4	618,84
Hidrofóbico	Ile	I	12	4,9	1.238,01
Hidrofóbico	Leu	L	15	6,1	1.697,55
Hidrofóbico	Phe	F	54	22,1	7.948,26
Básico	Lys	K	7	2,8	897,33
	Trp		n.d.	n.d.	n.d. 6,1
Total			244	100,0	28.813,1291

el 16,3%, los básicos 8,9%, los neutros 17,0% y los hidrofóbicos 57,8%. Así, los grupos ácido y básico estarían condicionando la carga de la lectina. En la misma tabla se observa que el aminoácido presente en mayor cantidad es la fenilalanina (Phe; 22,1%), mientras que los menos abundantes son tirosina y metionina, cada uno con 0,8%. En base a lo señalado anteriormente, podemos decir que la CsLEC es una proteína hidrofóbica. La presencia de seis residuos de cisteínas nos sugiere la posible formación de tres puentes disulfuro, lo que estaría relacionado con la estabilidad de la proteína.

La Figura 6 muestra la secuencia de un segmento de la región N-terminal de la CsLEC compuesta de 31 aminoácidos (D N Q R S F S F N R F N A A P N E N D L L F Q G D A S V S S T), la cual fue obtenida empleando un secuenciador automático de aminoácidos que emplea la técnica de degradación de Edman. Asimismo, se observa que el grado de homología secuencial de la región N-terminal va de 67,9 a 53,6% de identidad, en relación a las seis proteínas con mayor homología aminoacídica a la CsLEC (empleando el banco de datos de proteínas Swiss-Prot). El análisis de homología secuencial demostró que la CsLEC tiene similitud (67,9%) con la leucoaglutinina (lectina) de *Maackia amurensis* (Fabaceae, Papilionoideae) con sialilactosa.

Son alrededor de 500 las lectinas aisladas y caracterizadas. Todas estas lectinas forman un grupo heterogéneo de proteínas debido a sus claras diferencias en estructura, especificidad y actividades biológicas. Recientemente las lectinas vegetales han sido clasificadas en base a análisis estructurales y datos sobre homología de secuencias en 7 familias de proteínas relacionadas estructural y evolutivamente: (1) lectinas de leguminosas, (2) lectinas

ligadoras de quitina con dominios de heveína, (3) lectinas ligadoras de manosa de monocotiledóneas, (4) proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II, (5) las amarantinas, (6) lectinas relacionadas con jacalina y (7) lectinas del floema de Cucurbitáceas (Peumans y Van Damme, 2001).

En el presente estudio se ha encontrado que la lectina de *Caesalpinia spinosa* (CsLEC) purificada a partir de semillas corresponde a una proteína con un alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, lo que al parecer indicaría que se trata de una proteína altamente compacta y estable, y con un peso molecular de alrededor de 29 kDa. Oliveira *et al.* (2003) encontraron que la lectina purificada a partir del fruto (vainas) de la tara presentó un alto número de residuos ácidos e hidrofóbicos, y su peso molecular fue de ~12,5 kDa. En ambas lectinas purificadas de tara (semilla y fruto) existe un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, pero el peso molecular fue mayor en la semilla (~ 29,19 kDa) que en la vaina. Esta diferencia indicaría que las lectinas distribuidas en las semillas y frutos podrían pertenecer a diferentes familias y tipos de lectinas. Entre algunas de las lectinas con peso molecular parecido a la CsLEC se encuentran: la lectina purificada de semillas de *Phaseolus vulgaris* (isoforma PHA-L) con un peso molecular de 32 kDa y con la capacidad de aglutinar leucocitos; la lectina purificada de semillas de *Phaseolus vulgaris* (isoforma PHA-E) con un peso molecular de 34 kDa y con la capacidad de aglutinar eritrocitos (Chrispeels y Raikhel, 1991). No obstante, existen lectinas de peso molecular más elevado como son: la lectina de 40 kDa purificada de semillas de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2001); la lectina de 78 kDa purificada de

	10	20	30	% identidad
CsLEC	D N Q R S F S F N R F E A A P N E N D L L F Q G D A S V S S T			100,0
9257095	- D E L S F T I N N F - - V P N E A D L L F Q G E A S V S S T			67,9
1755080	- D E L S F T I N N F - - V P N E A D L L F Q G E A S V S S T			67,9
1755078	- D E L S F T I N N F - - L P N E A D L L F Q G E A S V S S T			64,3
6573439	- - - S F N F D K F - - V P N Q K N I I F Q G D A S V S T T			60,0
67467392	N D H L S F N F D K F - - V P N Q N N I L F Q G E A S V S T T			55,2
126087	- N E L S F N F D K F - - V P N Q N N I L F Q G V A S V S T T			53,6

Figura 6. Alineamiento de la secuencia N-terminal de CsLEC con otras secuencias reportadas en la base de datos SWISS-PROT. El alineamiento de los residuos aminoacídicos fue realizado con la ayuda del programa DNA Star (CA. USA). Las regiones sombreadas representan regiones consenso de la proteína. Entre las seis proteínas comparadas están: 9257095, leucoaglutinina (lectina) de *Maackia amurensis* con Sialilactosa (Kawaguchi *et al.*, 1974); 1755080, precursor de la lectina de *Maackia amurensis* (Van Damme *et al.*, 1997); 1755078, precursor de la lectina extraída de la corteza de *Maackia amurensis* (Van Damme *et al.*, 1997); 6573439, lectina Ii de *Ulex europaeus* (Hamelryck *et al.*, 1998); 67467392, lectina I (CSA-I) Anti-H(O) de *Cytisophyllum sessilifolium* (Konami *et al.*, 1992); 126087, lectina I (lectina de semilla Anti-H(O)) (LAA-I) de *Laburnum alpinum* (Konami *et al.*, 1991).

semillas de *Lepechinia bullata* capaz de aglutinar eritrocitos que exponen el antígeno Tn (GalNAc α -O-Ser/Thr), un marcador específico de muchos carcinomas humanos (Sanabria *et al.*, 2001); la lectina ligadora de manosa de 58 kDa purificada de semillas de *Parkia discolor* (Leite *et al.*, 2001) y la lectina de naturaleza ácida (123,5 kDa) extraída de semillas de *Luetzelburgia auriculata* que posee la capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo siendo inhibida por ácido N-acetil-D-neuramínico (Oliveira *et al.*, 2001).

La CsLEC es capaz de aglutinar preferentemente eritrocitos del grupo B Rh+ (3,86 μ g/ml) y de ser inhibida por D-glucosa, D-maltosa, D-manosa, D-glucosamina, N-acetilglucosamina (3,25 mM) y el agente quelante EDTA (0,31 mM), esto indicaba que sería una lectina tipo C dependiente de iones divalentes, tales como el calcio y manganeso.

Concerniente al estudio de homología secuencial se determinó que ésta pertenece a la familia de lectinas vegetales de Leguminosas, mostrando 67,9% de similitud con la leucoaglutinina de *Maackia amurensis* (Fabaceae, Papilionoideae) con sialilactosa y el precursor de la lectina de *Maackia amurensis*.

En un futuro, conociendo la estructura y función de la lectina de tara, podrían realizarse estudios frente a bacterias, hongos, virus y células tumorales, que causan daños a las plantas y el hombre.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Dr. José Casaretto (Universidad de Talca, Chile) por sus sugerencias y revisión técnica de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- AYOUBA, A.; CAUSSE, H.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; CABBILLAU, C.; ROGÉ, P. 1994. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem Syst. Ecol.* 22: 153-159.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40 (11):1515-39.
- CASTILLO-VILLANUEVA, A.; ABDULLAEV, F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de Investigación Clínica*. Vol. 57. N° 1. 55-64.
- CARVALHO, M.; SGARBIERI, V. 1998. Relative importance of phytohemagglutinin (lectin) and trypsin-chymotrypsin inhibitor on bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein absorption and utilization by the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44(5): 685-696.
- CHRISPEELS, M.; RAIKHEL, N. 1991. Lectins, Lectins genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*. Vol. 3, 1-9.
- COSTA, F.; SAMPAIO, A.; NEVES, S.; ROCHA, M.; BENAVIDES M.; FREITAS, A. 1999. Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansa multifida*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 5: 53-61.
- EDMAN, P.; BEGG, G. 1967. A protein sequencer. *Eur J Biochem.* 1: 80-91.
- FREIRE, M.; MACHADO, O.; SMOLKA, M.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.; MACEDO, M. 2001a. Isolation and characterization of isolectins from *Talasia esculenta* seeds. *J. Protein. Chem.* 20 (6): 495-500.
- FREIRE, M.; SILVA, A.; LIMA, M.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.; MACEDO, M. 2001b. TEL a novel lectin from *Talasia esculenta* seeds: isolation and cell migration inducing. 19th INTERLEC. Brazil.
- HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. 1998. Legume Lectin Structure. *Biochim. Biophys.* (1): 9-36.
- HENRIKSON, R.; MEREDITH, S. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high performance liquid chromatography in differentiating mouse astrocytes in primary culture. *Dev. Neurosci.* 1: 226-267.
- HUDAK, K.; WANG P.; TUMER, N. 2000. A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: depurination of the capped RNA template. *RNA*. 6: 369-380.
- KAWAGUCHI, T.; MATSUMOTO, I.; OSAWA, T. 1974. Studies on hemagglutinins from *Maackia amurensis* seed. *J. Biol. Chem.* 249 (9), 2786-2792.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; TOYOSHIMA, S.; OSAWA, T. 1991. The primary structure of the *Laburnum alpinum* seed lectin. *FEBS Lett.* 286 (1-2), 33-38.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. 1992. Correlation between carbohydrate-binding specificity and amino acid sequence of carbohydrate-binding regions of Cytisus-type anti-H(O) lectins. *FEBS Lett.* 304 (2-3), 129-135.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (259): 680-685.
- LEITE, K.; RAMOS, M.; CASTELLÓN, R.; MAIA, C.; GURGEL, M.; SOUZA, L.; CAVADA, B. 2001. Purification, chemical and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). 19th INTERLEC. Brazil.
- OLIVEIRA, J.; MELO, V.; CAMARA, M.; VASCONCELOS, I.; BELTRAMINI, L.; MACHADO, O.; PEREIRA, S.; FERNÁNDEZ, C.; NUNES, E.; MONTEIRO, A. 2001. Purification and physicochemical characterization of a legume lectin from *Luetzelburgia auriculata*. 19th INTERLEC. Brazil.

- OLIVEIRA, M.; BELTRAMINI, L.; DE SIMONE, S.; NASSER, M.; SILVA-LUCCA, R.; KIAN, M.; VIEIRA, C.; ALMEIDA, M. 2003.** Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. *J. Plant. Physiol.* 15(2): 119-122. Brazil.
- PEUMANS, W.; VAN DAMME E. 1995.** Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352
- PEUMANS, W.; HAO, Q.; VAN DAMME, E. 2001.** Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *The FASEB Journal.* 15: 1493-1506.
- PEUMANS, W.; VAN DAMME, E.J.M. 2001.** Taxonomical distribution of plant lectins. *19th INTERLEC.* Brazil.
- SANABRIA, E.; VEGA, N.; PÉREZ, G. 2001.** Isolation and characterization of a lectin from *Lepechinia bullata* seed. *19th INTERLEC.* Brazil.
- SHARON, N. Y H., LIS. 1989.** Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 246 (4927): 227-234.
- TOYAMA, M.; CARNEIRO, E.; MARANGONI, S.; AMARAL, M.; VELLOSO, L.; BOSCHERO, A. 2001.** Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *J. Prot. Chem.* 20(7): 585-591.
- VAN DAMME, E.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. 1997a.** Molecular cloning of the bark and seeds lectins from Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). *Plant Mol. Biol.* 33(3): 523-536.
- VAN DAMME, E.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. 1997b.** Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. *Glycoconj. J.* 14(4): 449-456.
- VILLARRUBIA, O.; DUBET, M.; MENÉNDEZ, J.; DE LA FUENTE, J.; NOA, E. 1995.** Estudios de 2 preparados de fitohemaglutinina obtenidos por diferentes métodos. *Rev. Cienc. Biol.* (En prensa).
- ZHU, K.; SHADE, R.; KOIWA, H.; SALZMAN, R.; NARASIMHAN, M.; BRESSAN, R.; HASEGAWA, P.; MURDOCK, L. 1998.** Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. *Plant Biology.* 95: 15123-15128.