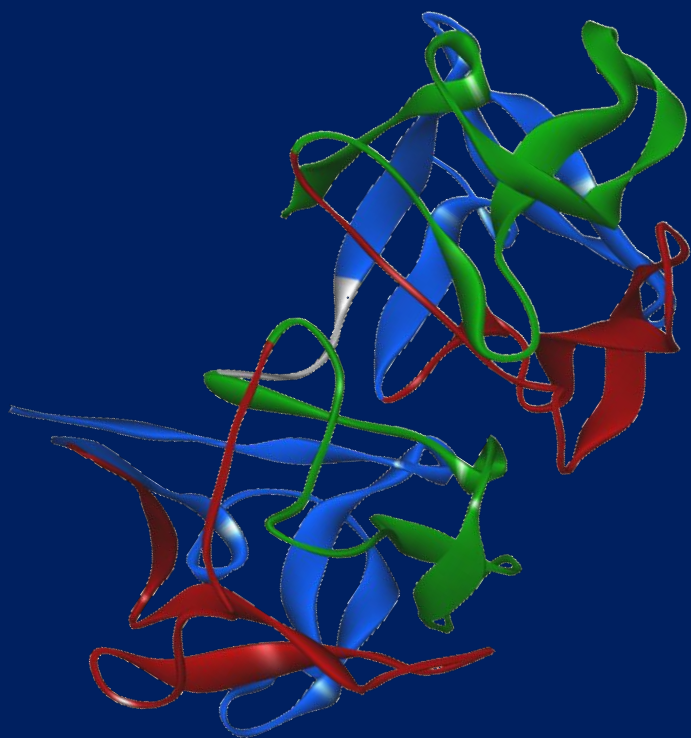


Estudio de las propiedades de lectinas vegetales.

Cynthia Varela Díez

Trabajo enmarcado en el proyecto de investigación del segundo curso de Bachillerato de Investigación y Excelencia del
I.E.S Andrés Laguna.
Curso 2018/2019



TUTORES DEL PROYECTO

José Miguel Ferreras

Catedrático de Universidad Dpto.
Bioquímica y Biología Molecular y
Fisiología. Facultad de Ciencias

Teresa Martín

Profesora de biología IES Andrés
Laguna.

ÍNDICE

	Página
1. Introducción	
1.1 Antecedentes	4
1.2 Marco teórico	5
1.3 Objetivos	7
2. Desarrollo	
2.1 Materiales empleados	7
2.2 Recetas	8
2.3 Metodología	
2.3.1 Aglutinaciones	9
2.3.2 Espectrofotómetro	12
2.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	13
2.4 Análisis e interpretación de resultados	
2.4.1. Concentración mínima de aglutinación	13
2.4.2. Especificidad por azúcares	14
2.4.3. Estructura	15
2.4.4. Evolución de las cadenas polipeptídicas de las lectinas	22
3. Conclusiones	23
4. Referencias	24

1. Introducción.

1.1 Antecedentes:

El estudio de las lectinas fue iniciado por Stillmark en 1888 cuando describió la hemaglutinación con *Ricinus communis*, nombrando **Ricina** a la proteína responsable de dicho proceso. Ese mismo año, Hellin descubrió el extracto tóxico de las semillas del *Abrus precatorius*, que también hemaglutinaba gracias a una proteína a la que puso el nombre de **Abrina**.

Las propiedades de la Ricina y Abrina fueron estudiadas en 1890 por Paul Ehrlich y probadas como antígenos, lo que dio paso a establecer los principios fundamentales de la inmunología.

Posteriormente, en 1919, James B. Sumner cristalizó la **Concavalina A**, presente en semillas de la planta *Canavalia ensiformis*, por lo que recibió un premio Nobel. Sin embargo, fue en 1936 junto a Howell, cuando reportó que la Concanavalina A aglutina células y precipitaba soluciones de glucógeno, observando que la hemaglutinación se inhibía por la sacarosa. Esto demostró que la proteína presentaba especificidad por el azúcar.

Finalmente, Boyd y otros introducen el término **lectina**, del latín *seleccionar* en 1954, definiéndola como: proteínas de origen no inmune, fijadora de carbohidratos con capacidad para aglutinar y precipitar glicoconjugados.

Durante las primeras décadas se pensaba que estas proteínas aglutinaban para todos los grupos sanguíneos indistintamente, lo cual era cierto para el ricino, pero no fue hasta 1948 cuando Renkonen descubrió que el extracto de semillas de *Lotus tetragonolobus* era específico del grupo sanguíneo 0.

Hace no mucho se utilizaba el término lectina para organismos vegetales, sin embargo en la actualidad, se ha descubierto que se pueden encontrar proteínas con características similares en bacterias, hongos, líquenes, moluscos y algunos mamíferos, que también se han añadido al grupo de lectinas, haciéndolo mucho mayor.

Los campos de aplicación biológica-funcional ubica a las lectinas en campos de investigación como la evaluación de citoquinas y la expresión de sus receptores en cultivos de linfocitos de pacientes con enfermedades como el SIDA, tuberculosis..., actividad antiviral de lectinas frente al VIH incluyendo la

susceptibilidad y resistencia que estos puedan desarrollar frente a lectinas, análisis de las funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas, inducción en la expresión de genes, detección de anormalidades cromosómicas, y en el campo de la glicoterapia y glicobiotecnología entre otras.

1.2 Marco teórico.

Las lectinas son un grupo de proteínas presentes en toda la escala evolutiva de origen inmune, sin actividad enzimática cuya particularidad es la de poder unirse de manera específica a azúcares, tanto en suspensión como formando glicoconjugados en las membranas plasmáticas de las células.

Este tipo de moléculas se encuentra distribuido en la naturaleza, en diferentes organismos como microorganismos, hongos, animales y plantas, principalmente en hojas, tallos, corteza y frutos. Sin embargo, se considera que las lectinas se encuentran en mayor cantidad en hojas y corteza, variando su concentración de acuerdo a las diferentes partes del vegetal entre una especie y otra (Van Damme y col., 1998; Hernández y col., 2005). A nivel celular, son sintetizadas, procesadas y transportadas como proteínas que se sintetizan en el retículo endoplasmático rugoso, y acumuladas en vacuolas de almacenamiento de proteínas (Maree, 2005).

Las funciones de las lectinas en organismos vegetales son tan variadas como desconocidas. Su actividad biológica depende directamente de la capacidad de estas de unirse a azúcares específicos. Las lectinas se enlazan a los monosacáridos de la membrana celular y actúan enviando señales y entregando mensajes a las células, lo que causa cambios bioquímicos en estas que se expresan como aglutinación, mitosis, división celular o desarrollo de la actividad antigénica.

En cuanto a la relación de la estructura con la actividad funcional, la habilidad de formar estructuras tipo red, permite a las lectinas formar interacciones complejas con las superficies de las células y glicoconjugados de la matriz que tienen sitios de unión múltiple que determinan su actividad biológica. Además, se las asocia con la germinación, mecanismos de defensa, almacenamiento de carbohidratos y

glicoproteínas, unión de bacterias fijadoras de nitrógeno en raíces de leguminosas, transporte y movilización de sustancias de reserva, regulación del crecimiento en la división celular y de mecanismos enzimáticos (Albersheim y Anderson, 2007).

Aunque, hoy en día se ha confirmado que están relacionadas con la capacidad de adhesión por reconocimiento en la membrana celular, lo que les confiere funciones biológicas como la mitosis en la que interviene la galectina-3 regulando el crecimiento celular, favoreciendo la supervivencia de las células e inhibiendo la apoptosis (Yang y col., 2006).

También, se ha encontrado que las lectinas ricina y abrina contienen un fragmento proteico activo que induce la modificación química en ribosomas y que inhibe los procesos moleculares de elongación polipeptídica a nivel celular.

Estudios realizados en semillas de diferentes leguminosas, han demostrado que un número amplio de glicoproteínas se encuentran en las semillas de las leguminosas y su capacidad de reconocimiento específico de carbohidratos sobre la pared celular de eritrocitos y microorganismos.

Finalmente, actúan como mecanismos de defensa de las plantas, por ejemplo: durante el ataque de patógenos, la interacción de manosa con la lectina se considera fundamental para el mecanismo de defensa de las plantas (Hwang y Hwang, 2011).

Las lectinas como biomoléculas presentes en frutas y plantas comestibles, pueden tener diferentes aplicaciones funcionales y de beneficio para la salud: agentes antivirales, actividad antibacteriana, antiparasitaria y anticancerígena. Gracias a esta última las lectinas han sido estudiadas en profundidad, ya que podrían ser capaces de reconocer células anticancerígenas, diferenciándolas de las normales.

A la hora de diferenciar las lectinas, se clasifican según las cadenas que tenga la proteína, siendo la cadena B la que posee la función de lectina, aunque existen RIPS (Ribosome Inactivating Proteins) del tipo 2 que también se componen de cadenas con la capacidad de unión a azúcares.

En este proyecto, se han utilizado tres lectinas vegetales que proceden del *Sambucusnigra*, o sauco. La SNA I, Nigrina b, y SNA II, se han obtenido de células del floema de la corteza de dicho árbol, en el cual, hay lectinas y RIPs de tipo 2.

1.3 Objetivos

El objetivo principal es estudiar la estructura de las lectinas de la corteza del *Sambucusnigra*, así como la especificidad por azúcares de dichas lectinas. Además, se pretender determinar el número de cadenas de las lectinas SNA I, nigrina b y SNA II, la capacidad de aglutinación de las mismas y estudiar la estructura de la SNA II.

2. Desarrollo

2.1 Materiales empleados.

➤ *Materiales*

- Tubos eppendorf (1 ml)
- Vaso de precipitados
- Probeta
- Micropipetas (0-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL)
- Gradillas
- Placa microtilter
- Balanza electrónica
- Agitador de tubos
- Papel parafilm
- Espectrofotómetro
- pH-metro
- Equipo de electroforesis: cristales con y sin forma, peines, separadores.

➤ *Sustancias químicas*

- Proteínas:

SNA I, SNA II, Nigrina b.

- Glúcidos:

Alpha-D-Fructopiranos, Beta-D-Galactopiranos, Alpha-D-Glucopiranos, Alpha-L-Ramnopiranos, Heparina, Fetuína, Pectina.

Agua destilada.

PBS (tampón fosfato salino)

Eritrocitos (45%).

➤ *Páginas web y programas informáticos:*

- Discovery Studio Visualizer
- Mega X
- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- ITasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)
- PDB (<http://www.rcsb.org/>)

2.2 Recetas.

- *Preparación del tampón de PBS:*

El PBS es una disolución salina isotónica. Es la disolución en la que se situarán los eritrocitos.

Se forma a partir de 5mM de NaH_2PO_4 y 0,14 M de NaCl, ambos disueltos en sus correspondientes concentraciones.

En una probeta, se añadieron 1750 μL de NaCl y 500 μL de NaH_2PO_4 .

Por último, se echa agua hasta enrasar en 50mL.

- *Gel de poliacrilamida:*

El gel de poliacrilamida sirve como filtro poroso en la electroforesis de proteínas. Está compuesto por un gel separador y un gel compactador.

Para preparar el gel separador, se echan en una probeta de 1000ml, 7.1mL de agua. A continuación, se echan 5mL de Tris 1.5M (pH 8.8), 200 μL de SDS al 10% con la pipeta y se añaden 7.5mL de acrilamida al 40%.

Se prepara APS (persulfato de amonio) al 10%, y se echan 200 μL con la pipeta.

Por último, se añaden 40 μL de TEMED.

Para el gel compactador, se sigue el mismo procedimiento, cambiando las cantidades: 6,3mL de agua, 2,5mL de Tris 0.5M (pH 6.8), 100μL de SDS 10%, 1mL de acrilamida al 40%, 100μL de APS 10%, 25μL de TEMED.

-Eritrocitos al 1%:

Se requerían glóbulos rojos a una concentración de 1% en un volumen de 10 ml. Inicialmente los glóbulos estaban al 94.7%, por lo que se vierten 9,9 ml de PBS además de 106 μL del hematocrito inicial utilizando una micropipeta y guantes.

2.3 Metodología.

2.3.1. Aglutinaciones:

La aglutinación es la agregación de células de forma sistemática. Estas células quedan unidas por medio de macromoléculas que actúan como intermediarias. En este caso, se utilizaran los eritrocitos como células y las lectinas como macromoléculas.

En este proceso, las lectinas se sienten atraídas a uno de los azúcares de la membrana celular debido a su especificidad, de forma que se une a ella y, si la lectina posee más de un lugar específico, esta también se unirá a otra célula, de manera que una misma lectina aglutina para varias células, formando así redes entre células y proteínas.

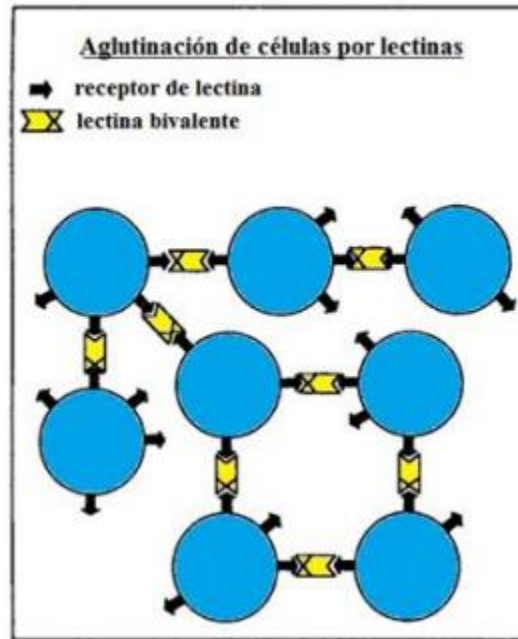


Figura 1. Modelo de aglutinación de las lectinas.

La primera aglutinación realizada tenía el objetivo de comprobar la concentración mínima para que se produjera dicho proceso. Para ello se ha utilizado: microplacas, micropipetas, PBS, eritrocitos al 1%, disolución SNA I, Nigrina b, SNA II.

Se utilizaron dos filas de pocillos para la SNA I y solo una fila para la Nigrina b y SNA II. En primer lugar, se vertió en cada uno de los pocillos, empezando en el segundo, 50 μ L de PBS, a los que se añadían 100 μ L de cada proteína en disolución en el primer pocillo, posteriormente se mezclaba con el PBS y se pasaba al siguiente hasta completar la fila. De esta manera, se reducía la concentración de todas las proteínas a la mitad que el anterior según se avanzaba. Finalmente, a cada pocillo se le añaden 50 μ L de eritrocitos al 1%(...página recetas).

Gracias a esta hemaglutinación, se podrá saber la concentración mínima a la que aglutinan las lectinas, es decir, la cantidad mínima en la que forman redes, pero si la concentración de lectinas no es suficiente, los eritrocitos sedimentarán en el fondo del pocillo de la microplaca. Así, después de cierto tiempo de reposo, se podrá saber en qué pocillos se ha producido la aglutinación, observándose en estos un color rojizo homogéneo, mientras que al ir disminuyendo a la mitad la concentración llegará uno en el que no habrá suficiente concentración proteica y

severá un punto rojo al final del pocillo. Los resultados de esta experiencia, se mostrarán más adelante.

La segunda aglutinación tiene como objetivo, conocer qué azúcar es específico para cada una de las lectinas a estudiar. Para ello, se utilizaron los siguientes azúcares en disolución: fructosa, galactosa, glucosa, L-ramnosa, fetuína, heparina y pectina; además de los materiales: microplacas, micropipetas, PBS y eritrocitos al 1%.

Nuevamente, se vierten 50 μ L de PBS en todos los pocillos, y 50 μ L de disolución del primer azúcar continuándose el proceso de manera similar a la primera aglutinación, reduciendo a la mitad la concentración de proteína a medida que se va avanzando. Del mismo modo, se vierten el resto de azúcares en filas diferentes. Posteriormente, se vierten 25 μ L de la proteína correspondiente en cada pocillo:

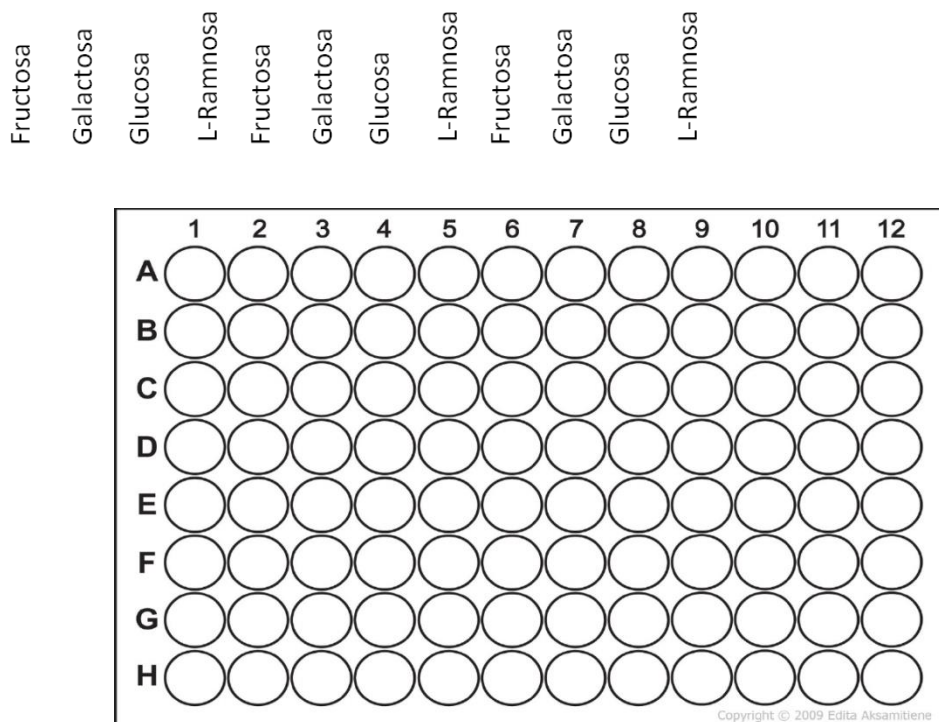


Figura 2. Pocillos segunda aglutinación.

Las columnas 1,2,3 y 4 será donde se echa SNA I con una concentración de 107,2 μ g/L; en las columnas 5,6,7 y 8 la Nigrina b a 52,8 μ g/L; y para finalizar, en las columnas 9, 10, 11 y 12 SNA II 159,2 μ g/L.

En otro microtilter, se echan fetuína, heparina y pectina con SNA II siguiendo el mismo procedimiento.

Por último, a cada pocillo se le añaden 25 µL de eritrocitos al 1%, de manera que cada pocillo tenga un total de 100 µL.

2.3.2 Espectofotómetro:

El espectofotómetro es una herramienta que mide las concentraciones de las lectinas, en este caso. Una luz incide sobre ellas haciendo que absorban dicha luz, y por lo tanto, pierda intensidad. La intensidad que se ha perdido se llama transmitancia (T).

Se colocan en el interior, disoluciones de las lectinas, para posteriormente calcular la absorbancia (A) para distintas longitudes de onda, siendo esta la cantidad de energía absorbida multiplicado por la sustancia sometida a una determinada longitud de onda.

Se puede decir que existe una relación directamente proporcional entre la absorbancia y la concentración de la sustancia, ya que, a mayor concentración, mayor capacidad tendrá esta para absorber la luz, aunque también influiría la longitud de onda que se utilice.

En nuestro caso, se utilizaron las longitudes de onda 230, 260, 280 y 320, medidas en nanómetros.

	Dilución	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₃₂₀	Concentración (mg/mL)	ε ₂₈₀ (mL/mg)
SNAI	1:100	0.1015	0.0152	0.0204	0.0033	1.71	1.193
Nigrina b	1:100	0.1864	0.0139	0.0306	-0.0066	2.60	1.177
SNAII	1:100	0.1372	0.0114	0.0220	-0.0115	3.48	0.632

Tabla 1. Determinación de la concentración de la proteína.

Para calcular la A, se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\text{Concentración proteína, } \mu\text{g/mL}) = 183 \times (A_{230} - A_{320}) - 75,8 \times (A_{260} - A_{320})$$

ε es el coeficiente de extinción y se calcula de este modo:

$$\epsilon = \frac{A}{c} \quad (\text{siendo } c \text{ la concentración})$$

2.3.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida:

El objetivo de la electroforesis es calcular el peso molecular de las tres lectinas de las que se dispone, a partir de la cantidad de espacio recorrido por una molécula en un gel sometiéndola a un campo eléctrico.

Se vierten las disoluciones de proteínas de manera vertical a través del gel, en este caso de poliacrilamida, estando el polo positivo en la parte superior y el negativo en la inferior. Las proteínas al sentirse atraídas por el polo negativo, tienden a descender con cierta dificultad de tránsito debido al gel. De esta manera, cuanto más pequeña es la molécula, más avanza por el gel ya que puede pasar con mayor facilidad entre las moléculas de este.

2.4 Análisis e interpretación de resultados:

2.4.1. Concentración mínima de aglutinación:

Se pretendía demostrar la especificidad de las tres lectinas que se utilizan en este proyecto por los azúcares, cuya característica les permite ser diferenciadas de cualquier otra proteína. Para ello, se realizó una aglutinación de SNA I, Nigrina b y SNA II, con el fin de saber cuál es la concentración mínima a la que aglutinan. El resultado obtenido fue el que se muestra a continuación:

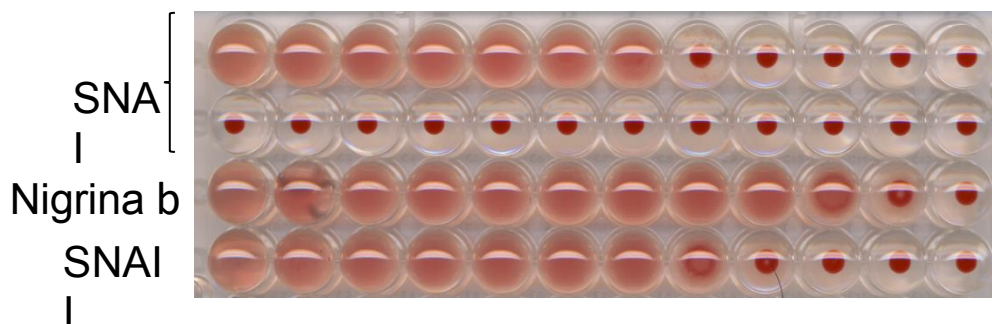


Figura 3. Primera aglutinación.

Se puede observar que la SNA I comienza a aglutinar en el octavo pocillo, la Nigrina b en el doceavo y la SNA II en el noveno, por lo tanto para conocer la concentración que se encuentra en cada uno de los anteriores pocillos, ya que estos son en los que se halla la concentración mínima a la que aglutina la lectina, se debe dividir la concentración inicial previamente medida en el espectrofotómetro entre 2 elevado al número del pocillo, ya que se iba reduciendo a la mitad la concentración a medida que se avanzaba de pocillo. Se calcularon dichas concentraciones, resultando:

- Concentración mínima SNA I: 0.667 $\mu\text{g/mL}$
- Concentración mínima Nigrina b: 0.634 $\mu\text{g/mL}$
- Concentración mínima SNA II: 6.796 $\mu\text{g/mL}$

2.4.2. Especificidad por azúcares:

Posteriormente, se realizó una segunda aglutinación en la que se incluyeron azúcares específicos distintos a cada disolución de lectina, con el objetivo de saber por cuál tienen afinidad dichas proteínas, ya que en la anterior solo había eritrocitos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos:

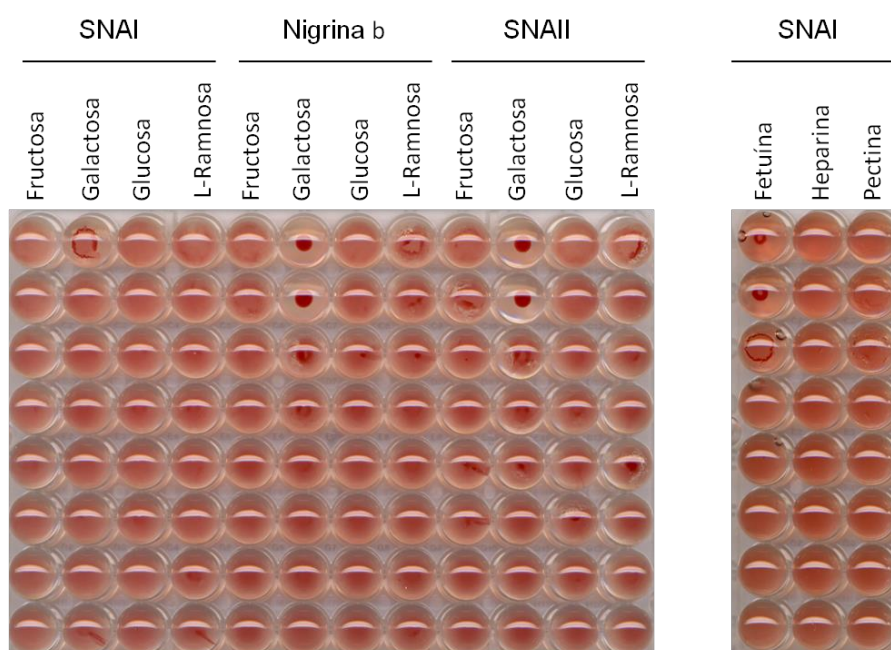


Figura 4. Segunda aglutinación para determinar especificidad por azúcares.

Se comienza con una concentración de azúcar de 125 mM y se van diluyendo a la mitad

Como se puede observar, la fetuína inhibe la aglutinación por SNA I y la galactosa la aglutinación por la Nigrina b y la SNA II.

2.4.3 Estructura.

Para determinar la estructura de las lectinas, se realizó una electroforesis cuyo resultado se ve en la siguiente figura:

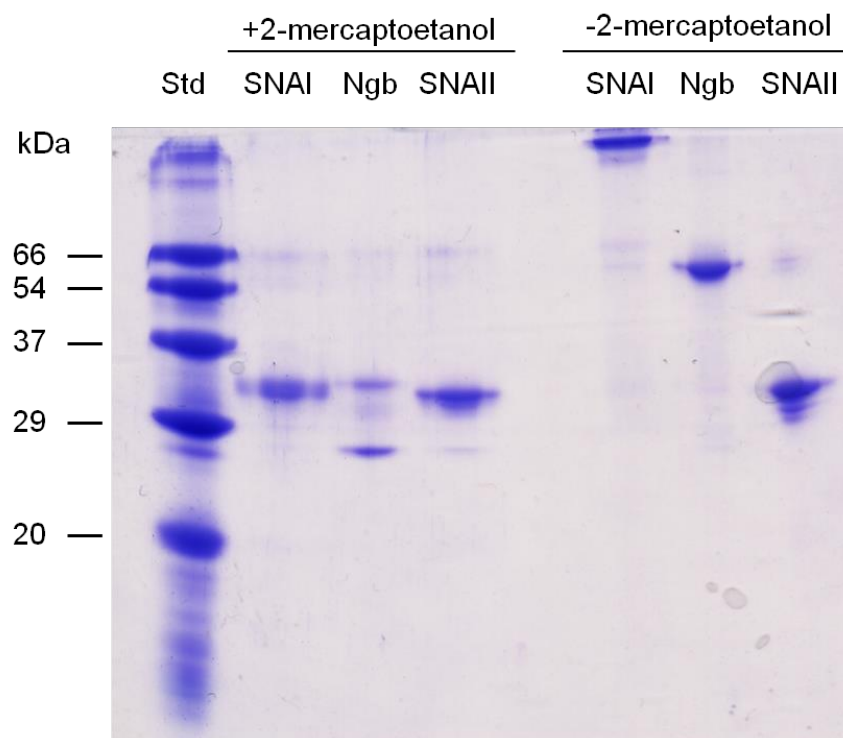


Figura 5. Bandas electroforesis.

La primera columna hace referencia a proteínas de peso molecular conocido, indicado en el margen izquierdo que nos servirán de guía para calcular los pesos de nuestras lectinas.

Las siguientes columnas se dividen en dos: el primero posee, además de las proteínas, 2-mercaptoetanol que es una sustancia capaz de romper puentes disulfuro de los aminoácidos de la cisteína, que se encuentran presentes en las proteínas y son responsables de la unión de varias cadenas de las biomoléculas. Sin embargo, el segundo grupo, no posee esta sustancia.

El 2-mercaptoetanol nos permite realizar un estudio de las lectinas respecto a sus cadenas:

- En la lectina SNA I, al añadirle mercaptoetanol, solo aparece una mancha. No obstante, se observa que la misma proteína en el segundo triplete tiene mayor peso molecular que las otras dos. Esto significa que tiene un gran peso molecular y, lógicamente, esto se debe poseer varias cadenas aunque solo aparezca una línea. Su explicación es que tienen similares pesos moleculares, por lo que se ven como una sola al romperse sus puentes disulfuro.

Tras una observación más detallada, se llegó a la conclusión de que la SNA I posee 4 cadenas iguales dos a dos, por lo que tendría dos cadenas a las que llamaremos A y otras dos cadenas a las que llamaremos B (2A y 2B).

- En el recorrido de la Nigrina b, se observan dos manchas diferenciadas al añadirle mercaptoetanol, a las que denominaremos A y B. Una de las cadenas, desciende más que la otra por lo que tendrían peso molecular distinto.
- La lectina SNA II, recorre la misma distancia tanto con 2-mercaptoetanol como sin él, lo que se puede interpretar como que solo posee una cadena.

Se procede a calcular su peso molecular. Para ello, se utilizaron las proteínas estándar como guía, midiendo la distancia desde el inicio del recorrido hasta cada una de las líneas, y se dividía entre la distancia desde el principio hasta el final de la muestra. Finalmente, se calculó el peso molecular de las lectinas de manera proporcional utilizando estándares de peso molecular conocido.

Se obtuvo un total de 33 kDa de las cadenas A Y B de SNA I, 32kDa de SNA II y en cuanto a la Nigrina b, se obtuvieron 27kDa en la cadena A y 33 kDa en la cadena B. Estos datos se han recogido en la siguiente gráfica:

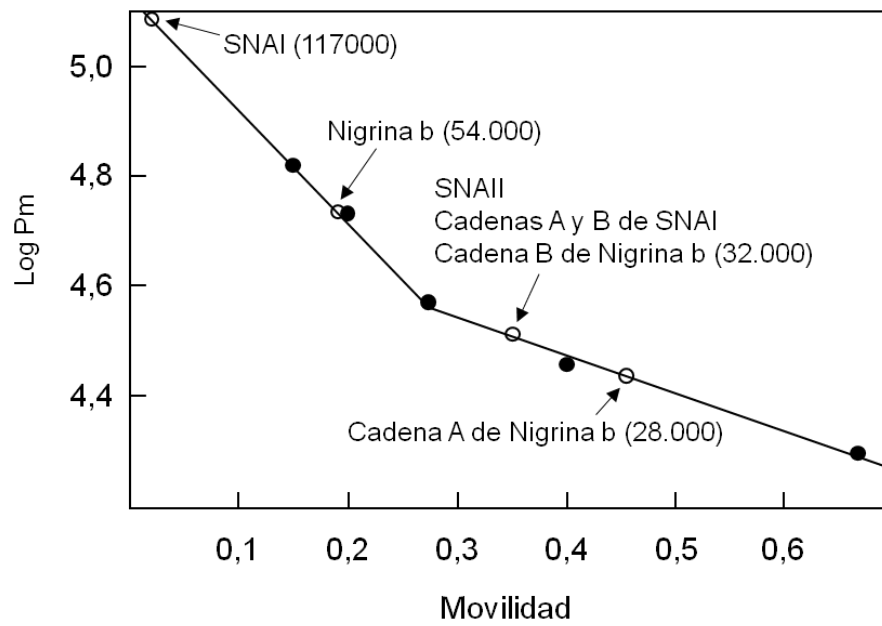


Figura 6. Movilidad y pesos moleculares.

Una vez calculados los pesos moleculares, se compararon las proteínas observando sus secuencias de aminoácidos. Estas secuencias, se obtuvieron del NCBI, y posteriormente fueron alineadas con el programa *Clustal Omega*.



Figura 7. Comparación de las secuencias de las lectinas.

Resaltado en rojo, se muestran las cisteínas que se unen con la siguiente, para darle estructura a la lectina a través de puentes disulfuro.

Además, se empleó ... donde se pudo identificar y estudiar el inicio de cada cadena, los péptidos de conexión y líder, y por último, la proporción de aminoácidos que coincidía en las cadenas, siendo representados por sus respectiva letra, que a mayor tamaño, mayor es la similitud entre una cadena y otra.

Esta figura, junto la que se añade a continuación, mediante su comparación se pudo determinar qué aminoácidos pertenecían al péptido líder, a las diferentes cadenas y al péptido de conexión.

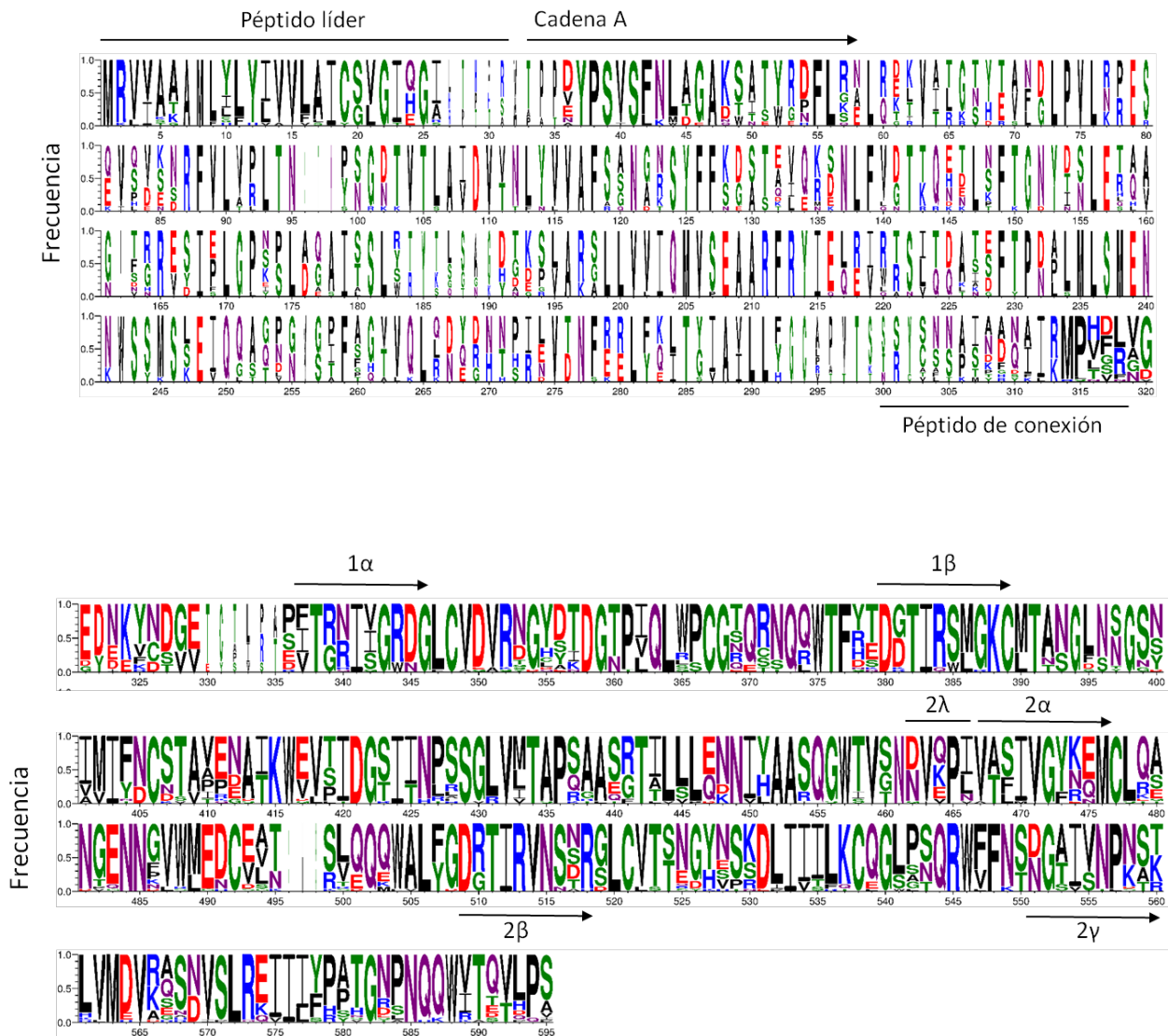


Figura 8. Logo de las secuencias de las lectinas de *Sambucus*.

La cadena A se muestra más estrecha y pequeña debido a que la SNA II solo se compone de cadena B. Además, cabe destacar que las cisteínas en su gran mayoría se localizan en el mismo lugar en las tres lectinas.

Una vez se realizó este estudio, se utilizaron los datos de la secuencia de aminoácidos de la SNA II, que es la lectina en la que nos centraremos, con el programa I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para llevar a cabo el modelado de la estructura de la misma. Tras varios días, recibimos las posibles propuestas de estructuras de las cuales se seleccionó la más probable, según el propio programa.

La estructura elegida fue la que se muestra aquí:

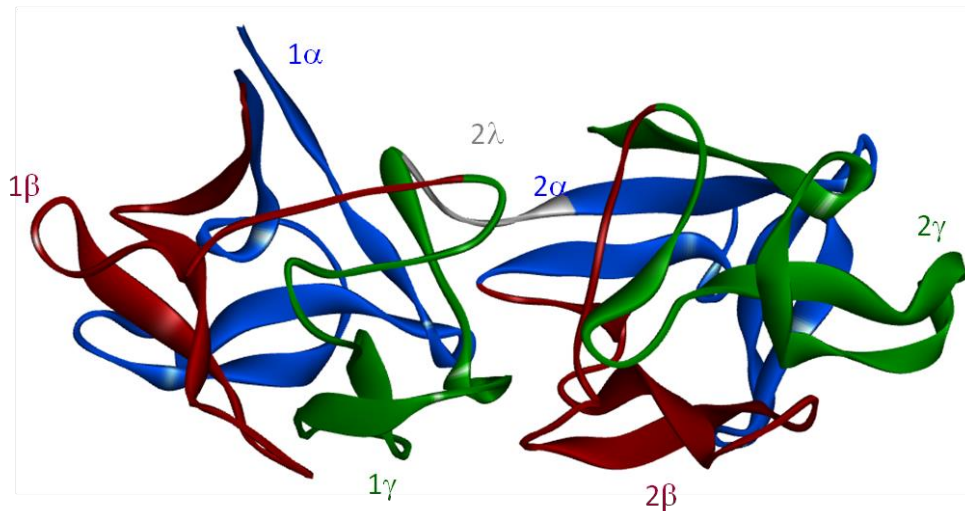


Figura 9. Estructura tridimensional de la SNA II.

Esta estructura solo posee cadena B, en la que se observan dos claros dominios unidos por un lazo, cada uno constituidos por 3 subdominios lamina β , por lo que su estructura se denomina de trébol β .

Como la SNA II tiene dos sitios de unión, está compuesta por dos lectinas homólogas.

El orden que seguirían las láminas es el siguiente:

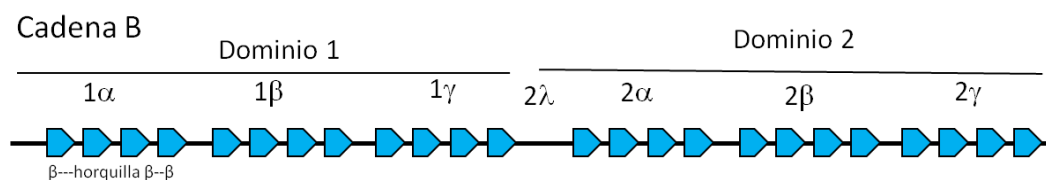


Figura 10. Composición de los dominios de la SNA II.

La SNA II posee cuatro uniones disulfuro de cisteínas, que se pueden observar en la siguiente figura expresada de forma lineal de la lectina, de color naranja.

Esta misma, la comparamos con la SNA I y Nigrina b, y observamos que la SNA I posee una cisteína libre que le sirve para unirse a las otras dos cadenas que contiene la SNA I como explicamos anteriormente.



Figura 11. Estructuras SNA I, Nigrina b y SNA II, respectivamente.

Estas figuras fueron realizadas y editadas con el programa *Discovery Studio Visualizer*.

2.4.4. Evolución de las cadenas polipeptídicas de las lectinas:

La evolución de las cadenas de la SNA I, Nigrina b y SNA II se puede saber gracias al árbol filogenético que relaciona varias especies estudiando cada uno de sus aminoácidos.

Se recopilaron una gran variedad de secuencias de aminoácidos de lectinas de *Sambucus* y se relacionaron constituyendo un árbol filogenético con el método *NeighbourJoining* del programa *Mega X*. Obteniéndose lo que se presenta en la siguiente figura:

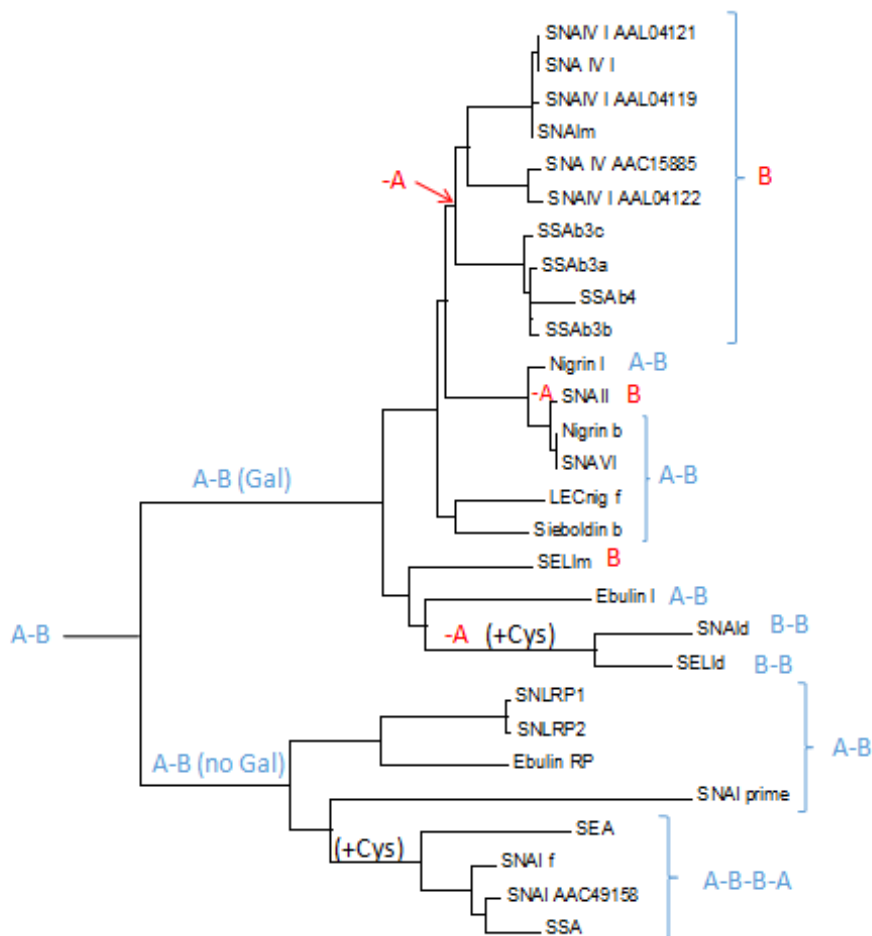


Figura 11. Árbol filogenético

En él observamos que todas las proteínas proceden de una común, que poseía 2 cadenas (A y B). Esta, se especializó debido a la evolución y se dividió: las que se unían a la galactosa y las que no.

Las que eran específicas de dicho monosacárido, volvieron a evolucionar y gran parte de ellas perdieron la cadena A como se indica en la figura, otras seguían manteniendo ambas cadenas, aunque pudo haber nuevas evoluciones que también la perdieron.

En el caso de la SNAI y SELI, perdieron su cadena A, pero ganaron una cisteína que les permitieron unirse a otra cadena B constituyendo como resultado dos cadenas B.

En cuanto a las no específicas para la galactosa, mantuvieron su estructura de cadena A y B, aunque en una de las bifurcaciones, se le añadió una cisteína a algunas de esas proteínas como la SEA, SNAI f, SNAI y SSA, que se unieron a otra cadena A-B, por lo que se componen de cuatro cadenas iguales dos a dos.

3. Conclusiones:

Atendiendo a los objetivos propuestos, se puede concluir que:

- Al analizar la aglutinación, la proteína con mayor capacidad de aglutinación es la Nigrina b, ya que aglutina los eritrocitos a una concentración de 0.634 $\mu\text{g/mL}$. Le sigue la SNA I, aglutinando a una concentración de 0.667 $\mu\text{g/mL}$. Por último, con menor capacidad, estaría la SNA II que aglutina eritrocitos a 6.796 $\mu\text{g/mL}$.

- En cuanto a la especificidad de cada una de las lectinas, se ha comprobado que la SNA I se inhibe de manera específica por la fetuína, la Nigrina b tiene especificidad por la galactosa y la SNA II, también.

- En relación con la cantidad de cadenas polipeptídicas, se ha determinado que la SNA I posee cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas A y dos cadenas B, unidas entre si mediante enlaces disulfuro. El peso molecular de esta, es de 32kDa. L

La Nigrina b, está formada por dos cadenas polipeptídicas; cadena A y cadena B y sus pesos moleculares son 27 kDa y 33 kDa respectivamente.

La SNA II está formada por una cadena polipeptídica B cuyo peso molecular es de 32 kDa.

- Centrando la atención en la SNA II, que ha sido la estudiada más a fondo, se puede afirmar que está formada por dos dominios, formados por láminas beta y unidos a través de un lazo 2λ , conformando una estructura de trébol β .

- Finalmente, sobre la evolución de las cadenas, se observa que en algunos casos se ha perdido la cadena A, y en otros se ha ganado una cisteína que le ha permitido a las proteínas conformar estructuras de doble cadena B o de 4 cadenas polipeptídicas A-B iguales dos a dos.

4. **Referencias.**

- (1) Castillo-Villanueva, A. y Abdullaev, F. (2005) Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. **Revista de Investigación Clínica** 57: 55-64
- (2) Hernández Díaz, P., Martín González, O. Rodríguez de Pablos Vélez, Y. y Ganem Báez, F. A. (1999) Aplicaciones de las lectinas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia** 15:91-95
- (3) Hernández Cruz, P., Pérez Campos, E., Martínez Martínez; L., Ortiz, B. y Martínez, G. (2005) Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. **Revista de Educación Bioquímica** 24: 21-27
- (4) Vázquez-Luna, A., Rivadeneyra-Domínguez, E. y Díaz-Sobac, R. (2012) Lectinas en frutas y plantas comestibles: Nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina. **CienciaUAT** 23: 60-66.