

Aislamiento, actividad biológica y caracterización bioquímica de lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA)

Juan-Pablo Huarachi-Valencia
Vicky-Cristina Gonzales-Alcos
Sheyla Cervantes-Alagon
Luz-Wilfreda Cusi-Zamata



DOI: 10.35622/inudi.b.029

EDITADA POR
INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE INNOVACIÓN CIENCIA
Y TECNOLOGÍA INUDI PERÚ



Aislamiento, actividad biológica y caracterización bioquímica de lectina de semillas de chenopodium quinoa willd. (cv. Salcedo-INIA)

DOI: <https://doi.org/10.35622/inudi.b.029>

Juan-Pablo Huarachi-Valencia

<https://orcid.org/0000-0002-9527-6952>

jhuarachi@unap.edu.pe

Vicky-Cristina Gonzales-Alcos

<https://orcid.org/0000-0003-1744-3548>

vcgonzales@unap.edu.pe

Sheyla Cervantes-Alagon

<https://orcid.org/0000-0002-7249-8966>

slcervantes@unap.edu.pe

Luz-Wilfreda Cusi-Zamata

<https://orcid.org/0000-0002-7245-0639>

lcusi@unap.edu.pe

Aislamiento, actividad biológica y caracterización bioquímica de lectina de semillas de chenopodium quinoa willd. (cv. Salcedo-INIA)

Juan Pablo Huarachi Valencia
Vicky Cristina Gonzales Alcos
Sheyla Cervantes Alagon
Luz Wilfreda Cusi Zamata
(Autores)

ISBN: 978-612-5069-12-2 (PDF)

Hecho el depósito legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2022-08182

DOI: <https://doi.org/10.35622/inudi.b.029>

Editado por Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú S.A.C
Urb. Ciudad Jardín Mz. B3 Lt. 2, Puno – Perú

RUC: 20608044818

Email: editorial@inudi.edu.pe

Teléfono: +51 973668341

Sitio web: <https://editorial.inudi.edu.pe>

Primera edición digital
Puno, agosto de 2022

Libro electrónico disponible en
<https://doi.org/10.35622/inudi.b.029>

Editores:

Wilson Sucari / Patty Aza / Antonio Flores /

Diseño de portada:

David Paucar Condori

Las opiniones expuestas en este libro es de exclusiva responsabilidad del autor/a y no necesariamente reflejan la posición de la editorial.

Publicación sometida a evaluación de pares académicos (Peer Review Doubled Blinded)

Publicado en Perú / *Posted in Peru*



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| SINOPSIS | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| CAPÍTULO I | 13 |
| MARCO TEÓRICO | 13 |
| 1.1 Naturaleza de las lectinas | 13 |
| 1.2 Especificidad de las lectinas | 17 |
| 1.3 Distribución de las lectinas | 18 |
| 1.4 Funciones biológicas | 19 |
| 1.4.1 Actividad antiviral | 20 |
| 1.4.2 Actividad antibacteriana | 21 |
| 1.4.3 Actividad antifúngica | 22 |
| 1.4.4 Actividad insecticida | 23 |
| 1.4.5 Toxicidad para animales superiores | 24 |
| 1.5 Aplicaciones | 25 |
| 1.6 La quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) | 27 |
| CAPITULO II | 29 |
| DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA Y MARCO METODOLÓGICO | 29 |
| 2.1. Descripción de problema | 29 |
| 2.2 Objetivos de investigación | 30 |
| 2.3 Método, diseño y tipo de investigación | 31 |
| 2.4 Cuadro de variables, temas o unidades de investigación | 31 |
| 2.5 Técnicas e instrumentos de investigación | 31 |
| 2.6 Procedimientos de investigación | 31 |
| 2.6.1 Material biológico | 31 |
| 2.6.2 Reactivos y equipos | 32 |
| 2.6.3 Extracción salina | 32 |
| 2.6.4 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100 | 33 |
| 2.6.5 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 | 33 |
| 2.6.6 Cromatografía HPLC de fase reversa | 33 |
| 2.6.7 Electroforesis en SDS-PAGE | 34 |
| 2.6.8 Prueba de hemaglutinación | 34 |
| 2.5.9 Prueba de bactoaglutinación | 37 |

| | |
|---|----|
| 2.6.10 Prueba de actividad insecticida | 38 |
| 2.6.11 Análisis de composición de aminoácidos | 38 |
| 2.6.12 Análisis estadístico | 41 |
| 2.7 Consideraciones éticas..... | 41 |
| CAPÍTULO III | 42 |
| EXPOSICIÓN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES | 42 |
| 3.1 Exposición resultados | 42 |
| 3.1.1 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100..... | 42 |
| 3.1.2 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75 | 43 |
| 3.1.3 Cromatografía HPLC de fase reversa | 45 |
| 3.1.4 Electroforesis en SDS-PAGE | 46 |
| 3.1.5 Estudio de la actividad hemaglutinante | 48 |
| 3.1.6 Estudio de inhibición de la actividad hemaglutinante por acción de carbohidratos..... | 50 |
| 3.1.7 Estudio de inhibición de la actividad hemaglutinante por agentes quelantes..... | 52 |
| 3.1.8 Estudio de la actividad bactoaglutinante | 53 |
| 3.1.9 Estudio de la actividad insecticida | 55 |
| 3.1.10 Determinación de la secuencia aminoácidica N-terminal y estudio de homología secuencial | 58 |
| 3.2 Discusión | 61 |
| 3.2.1 Aislamiento y purificación de CqLEC..... | 61 |
| 3.2.2 Actividad biológica de la CqLEC | 62 |
| 3.2.3 Caracterización bioquímica de la CqLEC..... | 65 |
| 3.3 Conclusiones..... | 67 |
| REFERENCIAS | 69 |
| ANEXOS | 77 |

SINOPSIS

Las lectinas actúan como moléculas de reconocimiento celular, y probablemente en la defensa vegetal. La CqLEC, lectina de *Ch. quinoa* cv Salcedo INIA, fue aislada, purificada y caracterizada a partir de 70 g de semillas a través de extracción salina, y la combinación de dos cromatografías de exclusión molecular tales como las de Sephadex G-100 y G-75 logrando obtenerse 5,53 mg/ml de proteína con actividad hemaglutinante, así como por HPLC de fase reversa a los 32 minutos con 54 % de tampón B indicando que poseía un bajo número de residuos hidrofóbicos en su estructura. Asimismo, el SDS-PAGE demostró que la lectina purificada fue homogénea ya que presentaba un solo componente correspondiente a una proteína de 12,82 kDa. Siendo que la CqLEC aglutinó eritrocitos humanos del grupo sanguíneo “O Rh+” con una CMH de 1,95 µg/ml, inhibido por fucosa (0,78 mM) y el agente quelante EGTA (0,1 mM), esto indicaba que sería una lectina ligadora de fucosa dependiente de iones divalentes tales como el calcio o el manganeso. Por otra parte, esta proteína mostró una bactoaglutinación específica para *E. coli* (CMB igual a 200 µg/ml), así como actividad insecticida en contra de larvas de *Symmetrischema plaesiosema* (1000 ppm of CqLEC, $P < 0,05$). El análisis completo de aminoácidos reveló que la CqLEC es una lectina de naturaleza ácida (70,54 % de residuos hidrofílicos y 29,46 % de residuos hidrofóbicos), prevaleciendo el ácido glutámico (33 %), con una masa molecular de 12,859 kDa. Por estudio de homología secuencial se determinó que ésta pertenece a la familia de lectinas vegetales de Leguminosas, mostrando 82,1 % de similitud con el precursor de la aglutinina I extraída a partir de la corteza de *Cladrastis kentukea*. La CqLEC también presentó residuos altamente conservados en su estructura tales como Leu 4, Ser 6 y Phe 7.

Palabras clave: lectina, *Chenopodium quinoa*, bactoaglutinación, actividad insecticida.

ABSTRACT

Lectins act as cell recognition molecules, and probably in plant defense. The CqLEC, lectin from *Ch. quinoa* cv Salcedo INIA, was isolated, purified and characterized from 70 g of seeds through saline extraction, and the combination of two molecular exclusion chromatographies such as Sephadex G-100 and G -75, obtaining 5.53 mg/ml of protein with hemagglutinating activity, as well as by reverse phase HPLC at 32 minutes with 54% buffer B, indicating that it had a low number of hydrophobic residues in its structure. Likewise, SDS-PAGE showed that the purified lectin was homogeneous since it had a single component corresponding to a 12.82 kDa protein. Being that the CqLEC agglutinated human erythrocytes of the “O Rh+” blood group with an MHC of 1.95 µg/ml, inhibited by fucose (0.78 mM) and the chelating agent EGTA (0.1 mM), this indicated that would be a fucose-binding lectin dependent on divalent ions such as calcium or manganese. On the other hand, this protein showed specific bactoagglutination for *E. coli* (CMB equal to 200 µg/ml), as well as insecticidal activity against *Symmetrischema plaesiosema* larvae (1000 ppm of CqLEC, $P < 0.05$). Complete amino acid analysis revealed that CqLEC is an acidic lectin (70.54% hydrophilic residues and 29.46% hydrophobic residues), with glutamic acid (33%) prevailing, with a molecular mass of 12.859 kDa. By sequential homology study, it was determined that it belongs to the family of vegetable lectins of Legumes, showing 82.1% similarity with the precursor of agglutinin I extracted from the bark of *Cladrastis kentukea*. The CqLEC also presented highly conserved residues in its structure, such as Leu 4, Ser 6 and Phe 7.

Keywords: lectin, *Chenopodium quinoa*, bactoagglutination, insecticidal activity.

INTRODUCCIÓN

Las lectinas representan glucoproteínas que cumplen diferentes funciones en las plantas desde reconocimiento celular hasta el de defensa vegetal constituyendo un mecanismo evolutivo para poder reconocer estructuras propias como exógenas y proteger al organismo del ataque por depredadores como insectos o promover su interacción con otros microorganismos.

Siendo que la quinua es un producto altoandino con alto contenido proteico es que resulta importante conocer todas las bondades de la lectina de quinua ya que a través de sus dominios de reconocimiento de carbohidratos puede abrir camino hacia el uso de estas glucoproteínas para el reconocimiento de grupos sanguíneos, bacterias y actividad insecticida entre otras.

Es por tal motivo que resulta importante promover el desarrollo de trabajos de investigación en recursos endémicos de la región para aumentar la soberanía biológica de proteínas con actividad biológica tipo lectina.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Naturaleza de las lectinas

El término lectina deriva del latín *legere* (seleccionado, escogido), el cual fue propuesto por Boy y Sharpleigh en 1954. Se refiere a la capacidad de unión selectiva de azúcares particulares. Este término fue generalizado en 1972 para todas aquellas proteínas ligadoras de azúcar y aglutinadoras de células que no poseen un origen inmune, encontradas en animales, vegetales y microorganismos (Sharon y Lis, 1989).

Las lectinas constituyen un gran grupo de proteínas o glicoproteínas que poseen la capacidad de aglutinar células, precipitar polisacáridos y glicoproteínas, debido a que se ligan específica y reversiblemente a determinados carbohidratos (Carvalho y Sgarbieri, 1998).

Las proteínas relacionadas con las lectinas de tipo C constituyen un grupo de proteínas estructuralmente homólogas, más con funciones distintas. Algunas de ellas exhiben actividad de tipo lectina, mientras que otras inducen efectos anticoagulantes en la aglutinación y agregación de plaquetas. Debido a sus variables actividades biológicas, las relaciones estructura-función de estas proteínas, son importantes en el estudio de las diferencias estructurales que conllevan a diferentes funciones biológicas (Kini, 1996).

Originalmente aisladas de plantas, principalmente de las semillas, también fueron obtenidas a partir de varios organismos animales (desde invertebrados hasta vertebrados) encontrándoseles en la superficie celular estando relacionadas con el reconocimiento célula-célula (Lis y Sharon, 1986).

También están presentes en microorganismos, como las enterobacterias, donde son esenciales para su adhesión al epitelio intestinal; en invertebrados son encontradas en la hemolinfa con propiedades de resistencia a infecciones (papel análogo al de las inmunoglobulinas presentes en vertebrados, ya que en su mayoría reconocen y ligan residuos de ácido siálico). En organismos animales más evolucionados, las lectinas son producidas en forma soluble o ligada a la membrana celular (Zatta et al., 1991).

Cuando se encuentran ligadas a la membrana celular, actúan como receptores para ligandos fisiológicos y, asimismo, participan en las interacciones célula-célula a través de su interacción con los carbohidratos localizados en las células adyacentes. Es así que, ellas juegan un papel fundamental en el control de varios procesos normales i/o patológicos en los seres vivos (Sharon y Lis, 1989).

Se puede decir que las lectinas se hallan presentes en todos los organismos investigados hasta hoy y la facilidad en ser purificada contrasta con la dificultad en la delimitación de sus funciones biológicas (Gabiús, 1994).

Las lectinas son fácilmente purificadas, a través de cromatografía de afinidad, sobre adsorbentes bioespecíficos tales como: polisacáridos nativos o modificados, glicoproteínas, glicopéptidos, mono o disacáridos ligados a una matriz (Lis y Sharon, 1986-).

Cuando la lectina posee una masa molecular lo suficientemente grande, como para ser excluida de las matrices cromatográficas, requiere de operaciones muy complicadas para su purificación tales como la de adsorción en eritrocitos fijados con formaldehído o glutaraldehído.

La detección de lectinas es realizada principalmente a través de la prueba de hemaglutinación, en la cual se lleva a cabo una dilución seriada de la lectina antes de la incubación con eritrocitos humanos o eritrocitos de otras especies animales, donde la menor concentración de lectina capaz de aglutinar eritrocitos es determinada visualmente o fotométricamente (Lis y Sharon, 1987).

Para minimizar los factores que se oponen a la hemaglutinación, se acostumbra emplear hematíes tripsinizados (Lis y Sharon, 1987) i/o fijados con glutaraldehído o formaldehído (Bing et al., 1967). La fijación permitirá que las células sanguíneas se mantengan estables y puedan ser utilizadas por períodos superiores a un mes, sin pérdida significativa de actividad (Nowak et al., 1976).

Usualmente, las lectinas constan de dos o cuatro subunidades. Cada subunidad tiene una masa molecular de 14 a 30 kDa y presenta un sitio de unión para carbohidratos (Sharon, 1993).

Los sitios de unión para carbohidratos se ajustan de acuerdo con el modelo de llave-cerradura, a través de un complejo sistema de puentes de hidrógeno. La

formación del complejo carbohidrato-proteína involucra el desplazamiento de una molécula de agua asociada con el grupo polar de la proteína y del carbohidrato, dando lugar a la estabilización del complejo (Loris, 2002).

La región molecular correspondiente al lugar de unión del carbohidrato es un dominio que reconoce una secuencia específica de residuos de azúcar, por lo cual es llamado Dominio de Reconocimiento del Carbohidrato (CRD). Cada subunidad de la lectina posee por lo menos un CRD. Esta divalencia o polivalencia permite su interacción con azúcares localizados en la superficie de células adyacentes, dando lugar a la aglutinación de células (Lis y Sharon, 1986). Algunas proteínas solubles ligadoras de lactosa poseen dos o más dominios diferentes de CRD, pero como están localizados en la misma cadena polipeptídica son homólogos (Ozeki et al., 1997).

De acuerdo a su requerimiento de calcio para su actividad de unión a carbohidratos, las lectinas aisladas a partir de animales están divididas en dos grupos principales: las lectinas de tipo C, que se caracterizan porque requieren Ca^{2+} para su actividad y los residuos de cisteína están unidos formando puentes disulfuro; poseen solubilidad variable y están localizadas en el ambiente extracelular. En cambio, las lectinas de tipo S se caracterizan porque no requieren Ca^{2+} para su actividad, las cisteínas se encuentran como tioles libres, son solubles en soluciones tampón, están localizadas tanto extra como intracelularmente y presentan una gran especificidad para azúcares que contienen β -galactósidos (Drickamer, 1988).

De acuerdo a lo que se ha mencionado anteriormente las lectinas de tipo S también son llamadas lectinas solubles ligadoras de β -galactósidos, las cuales son de naturaleza ácida, de baja masa molecular y constan de subunidades de 14 a 16 kDa. Requieren la presencia de grupos tioles libres para su unión a carbohidratos, tanto así que cuando son oxidadas pierden su actividad (Drickamer, 1988). En cuanto a su estructura primaria su secuencia aminoacídica se halla altamente conservada (66 a 92 %) en diversos tejidos y organismos, lo cual sugeriría que estas proteínas provienen de un gen ancestral común (Ali, 1991).

Así mismo, las lectinas tipo S se hallan divididas en tres subgrupos: las galectinas (poseen una secuencia aminoacídica característica, se ligan a galactosa y presentan

una masa molecular de 14 kDa. por subunidad), las de tipo P (son receptores de manosa 6 fosfato) y las pentraxinas (se ligan a galactanos, galactosa fosfatada, fosforilcolina y fosfoetanolamina). En mamíferos, las galectinas parecen estar involucradas en la regulación del crecimiento y la adhesión celular teniendo un papel muy importante en el origen de las neoplasias y respuestas inmunes (Barondes et al., 1994).

Aquellas proteínas hemaglutinantes de tipo S presentan un Dominio de Reconocimiento de Carbohidrato (CRD) compuesto de 36 aminoácidos altamente conservados y 19 residuos invariables. Ningún residuo de cisteína es invariable en este tipo de CRD, ya que se encuentran como grupos tioles libres (Taylor y Drickamer, 1993).

El CRD de las lectinas de tipo C se caracteriza porque está constituido de 100 a 130 residuos aminoacídicos. Este CRD de tipo C, ha sido identificado en varias proteínas ligadas a carbohidratos a través de la determinación de un grupo de residuos invariables que se localizan en posiciones distintas dependiendo de la proteína, siendo en promedio 15 los residuos conservados en las mismas posiciones relativas (Drickamer, 1988).

A pesar de la determinación de un CRD en lectinas asociadas a un azúcar específico, su presencia no implica necesariamente que la proteína tenga actividad de unión a carbohidratos (Drickamer, 1988).

Las regiones de la cadena polipeptídica donde se hallan los residuos conservados del CRD no deben ser vistos como entidades independientes, pues la capacidad de la lectina de ligarse a carbohidratos es modulada también por otros dominios (Gabiús, 1994). La interacción del CRD con otros dominios adicionales, determinan muchas de las funciones otorgadas a las lectinas (Taylor y Drickamer, 1993).

Algunas proteínas que no se caracterizan por ligar carbohidratos poseen en su estructura una región homóloga al CRD de las lectinas, como ocurre en la apoproteína surfactante pulmonaria, el receptor de la Ig E en los linfocitos T, la tetranectina, entre otras (Hirabayashi y Kasai, 1991).

Varias proteínas como las ligadoras de manosa (Drickamer et al., 1986), las lectinas de mosca y las lectinas de erizo de mar (Ozeki et al., 1991) presentan una secuencia

de reconocimiento de carbohidratos, lo que implica que este dominio de unión a carbohidratos puede estar presente en varias proteínas desempeñando un papel de reconocimiento de sustrato o de delimitación a un sitio específico (Gabiuss, 1994).

1.2 Especificidad de las lectinas

De acuerdo a la estructura y especificidad de sus dominios las lectinas vegetales son clasificadas por Peumans y Van Damme (1995) en los siguientes tres grupos:

- a. Merolectinas, que poseen un solo dominio de unión a azúcares.
- b. Hololectinas, las cuales presentan dos o más dominios idénticos o con un alto grado de homología secuencial, capaces de aglutinar células.
- c. Quimerolectinas, que se caracterizan por presentar por lo menos un dominio de unión a carbohidratos y otro dominio con actividad biológica distinta.

La “divalencia” o “polivalencia” de la lectina permite su interacción con azúcares localizados en la superficie de células adyacentes, dando lugar a una aglutinación de células (Lis y Sharon, 1986).

Cierta clase de lectinas vegetales bastante interesante es aquella representada por las Proteínas Inactivadoras de Ribosomas (RIPs), enzimas con actividad RNA glicosidasa capaces de reconocer una región altamente conservada en el RNAr 28S procediendo a clivar el enlace glicosídico entre una adenina y el nucleótido. Por consiguiente, la remoción de la adenina conlleva a una inestabilidad del RNA ribosomal impidiendo la síntesis de proteínas (Peumans et al., 2001).

Las RIPs se hallan divididas en dos clases principales dependiendo de la composición de sus subunidades (Barbieri et al., 1993), así tenemos: Las RIPs de tipo I, que son polipéptidos de cadena simple con una masa molecular de aproximadamente 30 kDa. y con un punto isoeléctrico extremadamente básico (pH > 9,5); mientras que las RIPs de tipo II, son proteínas heterodiméricas con una cadena funcionalmente semejante a las RIPs de tipo I y otra presentando una actividad característica de lectina siendo capaces de reconocer carbohidratos en las superficies celulares (Girbes et al., 1996).

1.3 Distribución de las lectinas

De las muchas lectinas vegetales que han sido caracterizadas, la mayor parte correspondiente a lectinas secretorias, se sabe que ellas ingresan al sistema secretor para acumularse posteriormente en las vacuolas, pared celular y espacios intercelulares. Por ejemplo, lectinas bien conocidas como la fitohemaglutinina, la concanavalina A, la aglutinina de soja (*Glycine max*) y la lectina de arveja (*Pisum sativum*) se encuentran en niveles relativamente altos dentro de las vacuolas de los cotiledones (8 % de la proteína total); mientras que en bajos niveles dentro del eje embrionario de las semillas. Estas lectinas son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla junto con algunas de las proteínas de almacenamiento (albúminas y globulinas) más abundantes de la misma. Durante la germinación y crecimiento de la plántula, las lectinas al igual que otras proteínas de almacenamiento son catabolizadas por proteasas para suministrar aminoácidos. Las lectinas también a menudo son abundantes en órganos vegetativos tales como raíces, rizomas, hojas y tallos. Asimismo, como ya se mencionó con anterioridad, algunas de estas lectinas son vacuolares, mientras que otras tales como la lectina ligadora de quitina proveniente de semilla de *Datura stramonium* son extracelulares. A comparación de las dicotiledóneas, las lectinas vacuolares presentes en semillas de cereales son menos abundantes (1 µg/grano seco) presentándose solamente en capas celulares específicas del embrión (por ejemplo, la aglutinina de germen de trigo presente en la coleoriza y cofia del embrión) (Etzler, 1986).

Aunque se han propuesto muchas funciones para las lectinas vegetales (Etzler, 1986), se cree que su función más probable de las lectinas vacuolares corresponde a la defensa vegetal. De otro lado, se ha encontrado que las lectinas radiculares extracelulares están involucradas en el reconocimiento de bacterias (*Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp.) con la finalidad de establecer la simbiosis como fuera primero propuesto por Bohlool y Schmidt (1974). Las lectinas radiculares son un importante determinante de la especificidad de hospedero (Díaz et al., 1989), sin embargo, su papel podría no estar relacionado con el reconocimiento específico lo cual parece ser mediado por pequeños ácidos grasos acilados y tetrasacáridos sulfatados (Lerouge et al., 1990), así las lectinas podrían servir más bien para aglutinar un gran número de bacterias en la superficie de los pelos radiculares. Su papel en el establecimiento de la simbiosis podría derivarse de la capacidad de las

lectinas para aglutinar e inmovilizar bacterias como una reacción de defensa (Chrispeels y Raikhel, 1991).

Hay un gran número de rutas por las que las lectinas vacuolares pueden interactuar con moléculas de dentro y fuera de la célula. Primero, cuando las semillas secas se imbiben de agua, las proteínas vacuolares y especialmente las lectinas son descargadas dentro del agua de imbibición. Esto da lugar a la presencia de lectinas en las cercanías de la semilla en germinación, donde ellas pueden interactuar con patógenos potenciales. Segundo, cuando las semillas u otros órganos vegetales son comidos por los predadores, las lectinas son descargadas desde las estructuras celulares dañadas de los tejidos vegetales. Estas lectinas entonces entrarían en contacto con las glicoproteínas de las células epiteliales que revisten el tracto intestinal de los predadores, probablemente para inhibir la absorción de nutrientes. Tercero, cuando las hifas de los hongos se desarrollan dentro de los tejidos vegetales, ellas son capaces de dañar la compartimentalización celular ocasionando la liberación de lectinas vacuolares que podrían inhibir el crecimiento adicional de las hifas (Fountain et al., 1977; Peumans y Van Damme, 1995).

Además, cabe indicar que, una especie vegetal es capaz de contener varias lectinas estructuralmente relacionadas que tengan diferentes propiedades biológicas. Por ejemplo, el ricino contiene dos lectinas distintas que están estructuralmente relacionadas y poseen diferentes propiedades biológicas: la ricina y la aglutinina de *Ricinus communis*. La ricina es altamente citotóxica, pero una aglutinina débil; mientras que la aglutinina de *R. communis* es citotóxicamente débil, pero una aglutinina fuerte (Chrispeels y Raikhel, 1991).

1.4 Funciones biológicas

En los vegetales, la mayor parte de las lectinas se encuentran en órganos de reserva lo cual da una evidencia indirecta de su papel como proteínas de defensa. Aun 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 juegan 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 glicoconjugados de otros organismos (Peumans y Van Damme, 1995).

1.4.1 Actividad antiviral

Casi todas las RIPs con actividad antiviral comprobada hacia virus vegetales corresponden a las RIPs de tipo I, a excepción de la RIP tipo 2 de *Eranthis hyemalis*. Asimismo, son tres los posibles mecanismos que podrían estar implicados en la actividad antiviral de las RIPs. Primero, las RIPs actuarían directamente sobre las partículas virales o los ácidos nucleicos virales por medio de su actividad polinucleótido: adenosina glicosidasa. Segundo, las RIPs harían su ingreso de manera selectiva hacia el citosol de las células infectadas destruyendo la maquinaria de la síntesis proteica de tal forma que el virus no pueda replicarse e infectar células vecinas. En este llamado modelo de “suicidio local”, el acceso al citosol llega a ser posible cuando la integridad de la membrana plasmática es rota por un vector viral, tal como un áfido o cuando las células son dañadas por el proceso de inoculación mecánica. Tercero, las RIPs actuarían a través de la activación del sistema de defensa vegetal (Peumans et al., 2001; Hudak et al., 2000).

El hecho de que surja un efecto directo sobre las partículas virales intactas es improbable, debido a que los ácidos nucleicos se encuentran protegidos físicamente de la actividad polinucleótido: adenosina glicosidasa de las RIPs. Sin embargo, tan pronto como las partículas virales se desensamblan en la célula, el RNA o el DNA viral puede ser atacado o deadenilado por las RIPs. Además, se ha encontrado que la proteína antiviral de la *Phytolacca americana* puede inhibir la traducción del RNA viral correspondiente a la capsida sin que los ribosomas de la célula sean depurinados. Lo que se cuestiona es, sin embargo, si el daño o la inhibición de la traducción del RNA viral es de alguna relevancia in vivo: si la célula es dañada durante la infección, la pérdida de la integridad celular casi inevitablemente dará lugar a una degradación de proteínas y ácidos nucleicos por lasas endógenas liberadas a partir de los lisosomas; en el caso de que las partículas virales ingresaran exitosamente al citoplasma sin alterar la integridad celular, no habrían moléculas de RIPs alrededor para dañar el RNA. El mismo razonamiento sustenta la importancia de la inactivación de los ribosomas por las RIPs en la hipótesis del suicidio local. Este modelo también implica que la infección viral esté acompañada por un severo daño celular. Ya que la síntesis de proteínas se detendría casi instantáneamente cuando las células perdiesen su integridad

estructural, la depurinación de los ribosomas por las RIPs podría escasamente tener un efecto directo (Peumans et al., 2001).

1.4.2 Actividad antibacteriana

La pared celular de las bacterias no solamente evita alguna interacción entre los glicoconjugados presentes sobre su membrana y las proteínas de ligamiento de carbohidrato (lectinas), sino que también impide que estas proteínas puedan penetrar en el citoplasma. Además, las lectinas vegetales no pueden alterar la estructura y/o permeabilidad de la membrana o perturbar los procesos intracelulares normales de los microbios invasores. Si bien es cierto que las lectinas juegan un papel en la defensa vegetal contra las bacterias, ésto se da a través de un mecanismo indirecto que está basado en interacciones con los carbohidratos de la pared celular o glicanos extracelulares. Se ha sugerido, por ejemplo, que la lectina de papa (la cual es considerada como una proteína de la pared celular) inmoviliza cepas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum*. En cambio, las cepas bacterianas virulentas no fueron reconocidas por la lectina, escapándose de su actividad ligadora, siendo por tanto capaces de multiplicarse y propagarse sobre la planta (Sequeira y Graham, 1977).

Otro mecanismo indirecto de defensa vegetal es, por ejemplo, el bloqueo de los movimientos de bacterias normalmente móviles en la interfase aire-agua por la lectina obtenida de la semilla del chamico (*Datura stramonium*) (Broekaert y Peumans, 1986). En vista a que las preparaciones de lectina utilizadas en estos experimentos fueron esencialmente puras (purificadas por cromatografía de afinidad) y los efectos fueron completamente revertidos por fetuina (la cual es fuertemente enlazada por la lectina), la pérdida de motilidad podría ser adjudicada con certeza a la lectina. Así mismo, existe evidencia de que el bloqueo de la motilidad bacteriana in vitro está correlacionado con una liberación rápida y altamente específica (durante la imbibición) de lectina a partir de la cubierta y la epidermis de la semilla. Por neutralización del movimiento quimiotáctico de la bacteria del suelo hacia la semilla germinada, es que la lectina puede prevenir la invasión de las raíces de las plántulas por bacterias potencialmente dañinas. Debido a que recientes estudios sobre el ligamiento de las lectinas vegetales en los peptidoglicanos de la pared celular bacteriana indican que varias lectinas correspondientes a semillas de leguminosas interactúan fuertemente con el ácido

murámico, el ácido N-acetilmurámico y el muramil dipéptido, es que nuevos esfuerzos están siendo enfocados al esclarecimiento de su participación en la defensa vegetal contra microbios (Ayoub et al., 1994).

1.4.3 Actividad antifúngica

Aunque las lectinas vegetales no puedan penetrar el citoplasma de las células fúngicas debido a la presencia de una gruesa y rígida pared celular, (por ejemplo, a través de la alteración de la estructura y/o permeabilidad o una alteración de los procesos intracelulares normales), es probable que ejerzan efectos indirectos basados en la capacidad de ligamiento de las lectinas sobre los carbohidratos expuestos en la superficie de la pared celular fúngica (Peumans y Van Damme, 1995).

En virtud de su especificidad, las lectinas ligadoras de quitina parecen tener cierto papel en la defensa vegetal contra los hongos (e insectos). Los estudios *in vitro* que demostraron la capacidad de la aglutinina de germen de trigo (WGA) de inhibir la germinación de esporas y el crecimiento hifal de *Trichoderma viridae*, apoyaron fuertemente la hipótesis del papel antifúngico de las lectinas vegetales ligadoras de quitina; hasta que se demostró que la inhibición del crecimiento fúngico fue debido a la presencia de quitinasas contaminantes en la preparación de lectina (Schlumbaum et al., 1986). Aunque este hallazgo comprometió al principio la actividad antifúngica propuesta para las lectinas vegetales, una prueba más definitiva fue llevada a cabo con la lectina libre de quitinasa proveniente de ortiga (*Urtica dioica*) la cual inhibía el crecimiento de *Botrytis cinerea*, *Trichoderma hamatum* y *Phycomyces blakesleanus* (Broekaert et al., 1989). El mecanismo exacto por el cual actúa la lectina de ortiga todavía no ha sido dilucidado, pero ciertamente no se halla basada en una actividad quitinasa y tampoco afecta el metabolismo normal de las células fúngicas. Al parecer, sólo la síntesis de la pared celular resulta ser afectada como producto de una síntesis y/o deposición alterada de quitina (Van Parijs et al., 1992). A pesar de la actividad antifúngica mostrada *in vitro* por la lectina de ortiga, aún se desconoce si tiene alguna actividad protectora *in vivo*, ya que esta lectina no es capaz de matar las esporas que empiezan a germinar o el micelio que se desarrolla. Considerando los efectos alteradores de la lectina de ortiga sobre la pared celular fúngica y la morfología de la estructura hifal, se cree que la lectina de ortiga está involucrada en el control de la colonización de

los rizomas por la endomicorriza. Tal papel concuerda parcialmente con la localización de la lectina en los rizomas y las semillas (Peumans y Van Damme, 1995).

Como ya se mencionó, algunas otras proteínas vegetales ligadoras de quitina consideradas como lectinas tienen propiedades antifúngicas. En un primer grupo están las merolectinas ligadoras de quitina, las cuales son proteínas pequeñas compuestas de un único dominio de ligamiento de quitina. La heveína, un polipéptido de 43 aminoácidos proveniente del látex del árbol del caucho (*Hevea brasiliensis*), tiene actividad antifúngica comparable al de la lectina de ortiga (Van Parijs et al., 1991). Otras proteínas del mismo grupo, por ejemplo, son polipéptidos ligadores de quitina compuestos de 30 aminoácidos provenientes de semillas de *Amaranthus caudatus*, las cuales manifiestan propiedades antifúngicas más potentes, pero aún incapaces de matar completamente al hongo (Broekaert et al., 1992). Las únicas lectinas vegetales que pueden ser consideradas proteínas fungicidas son las quimerolectinas pertenecientes a las quitinasas de clase I. Las pruebas in vitro con las enzimas purificadas, así como los experimentos con plantas transgénicas, han demostrado que las quitinasas de clase I confieren resistencia en contra de hongos fitopatógenos (Collinge et al., 1993).

1.4.4 Actividad insecticida

En vista a que las células epiteliales a lo largo del tracto digestivo de insectos fitófagos están directamente expuestas al contenido de la dieta y que las glicoproteínas son los principales constituyentes de estas membranas, el lado luminal del intestino está literalmente cubierto de sitios potenciales para el ligamiento de las lectinas. Por lo tanto, uno fácilmente puede imaginar que el ligamiento de la lectina a un receptor glicoproteínico provoque que el insecto sea repelido, retarde su crecimiento e incluso muera (Zhu et al., 1998).

Aunque es muy probable que la toxicidad de algunas lectinas está basada en el ligamiento específico a glicoconjugados en alguna parte dentro del intestino del insecto, el mecanismo exacto de acción de las lectinas vegetales es desconocido. Sin embargo, tres tipos de interacciones son posibles, así tenemos: (a) ligamiento de las lectinas a la quitina de la membrana peritrófica, (b) ligamiento de las lectinas a glicoconjugados expuestos sobre la superficie de células epiteliales a lo largo del

tracto digestivo, y (c) ligamiento de las lectinas a enzimas digestivas glicosiladas (Peumans y Van Damme, 1995).

1.4.5 Toxicidad para animales superiores

Al igual que en insectos, las células epiteliales a lo largo del tracto digestivo de animales superiores están completamente expuestas a los contenidos de la dieta. Ya que las células en el lado luminal del tracto digestivo están cubiertas con glicoproteínas de membrana y mucinas altamente glicosiladas, es que hay menos blancos para las interacciones con las lectinas vegetales de la dieta. Tomando en consideración la diversidad de lectinas y su especificidad para glicanos animales, uno fácilmente puede deducir que estas proteínas están involucradas en la protección de las plantas en contra de predadores animales (Zhu et al., 1998).

La mayor parte de nuestro conocimiento actual acerca de las propiedades tóxicas de las lectinas vegetales y los efectos que ellas provocan en animales y humanos han sido obtenidos de experimentos nutricionales con la hemaglutinina purificada de *Phaseolus vulgaris* (PHA) y casos de envenenamiento accidental en humanos por la ingesta de frijoles crudos o cocinados insuficientemente. La PHA ingerida, la cual es altamente resistente a proteasas intestinales, se liga a las células de borde en cepillo del intestino donde ésta es rápidamente endocitada. Cuando la lectina ingresa a las células, ésta induce una actividad metabólica intensa que eventualmente conlleva a hiperplasia e hipertrofia del intestino delgado. Además, la ingestión de PHA o frijoles crudos ocasiona una náusea aguda seguida por vómito y diarrea. La molestia es tan severa que los animales de laboratorio son muy renuentes a consumir toda la dieta conteniendo PHA, llegando en algunos casos a morir de hambre. Los efectos severos de la PHA ilustran el potencial de las lectinas en la protección contra predadores (Pusztai et al., 1990).

Aunque la mayor parte de la investigación sobre lectinas tóxicas han sido hechas con PHA, hay suficiente evidencia de que otras lectinas provocan efectos similares. Por ejemplo, las lectinas de la corteza del algarrobo negro (*Robinia pseudoacacia*) y del saúco (*Sambucus nigra*) ocasionan los mismos síntomas de toxicidad severa que la PHA. Debido a que ambas lectinas de corteza son abundantes, el algarrobo negro al igual que el saúco, nunca son atacados por roedores, venados u otros animales de vida salvaje; mientras que la corteza de especies desprovistas de

lectina, por ejemplo: el álamo, el sauce y la manzana silvestre, son el alimento favorito para los mismos animales (Peumans y Van Damme, 1995).

Se ha reportado varias lectinas aisladas de semillas y órganos de almacenamiento vegetativo que se ligan a la mucosa intestinal de ratas alterando la función normal de su intestino. Además, algunas de ellas causan efectos sistémicos tales como un agrandamiento del páncreas. Asimismo, la presencia de proteínas moderadamente tóxicas en semillas y órganos de almacenamiento vegetativo pueden representar una adaptación co-evolutiva frente a animales hervíboros. Aunque la presencia de lectinas tóxicas no pudiera proteger completamente la semilla o una parte comestible de la planta, la repelencia causada en el animal podría ser benéfica para la sobrevivencia de la especie vegetal (Pusztai et al., 1993).

1.5 Aplicaciones

Biotechnológicamente, las lectinas en su mayoría de origen vegetal están siendo empleadas en cromatografía de afinidad para el aislamiento de ciertas enzimas glicosiladas, así tenemos: la Concanavalina A que se une específicamente a α D-Glucosa, α D-Manosa. Otros ejemplos lo constituyen la lectina de la soja, que se une a α -galactosa y *N*-acetil-D-galactosamina, y la lectina de germen de trigo que se une a *N*-acetil-D-glucosamina (Lis y Sharon, 1986).

La especificidad de unión a ciertos carbohidratos es también muy útil en los estudios de aislamiento de subpoblaciones celulares, grupos sanguíneos y caracterización de otros tipos de células (Sakakibara et al., 1985). De este modo, es que se puede llevar a cabo la selección de células cancerosas, lo cual parece estar relacionado con la forma de agrupamiento generado por las interacciones entre las lectinas y los receptores de superficie celular; mientras que en las células normales también se da este tipo de interacciones, pero la distribución celular es más homogénea (Sharon, 1983).

La importancia de las lectinas para el diagnóstico microbiológico justamente se fundamenta en el hecho de que algunas de estas moléculas promueven la aglutinación específica de ciertas bacterias. De este modo, *Neisseria gonorrhoeae* puede ser diferenciada de otras especies del mismo género o de bacterias análogas, por la aglutinación que se produce con la lectina del germen de trigo (Schalla et al., 1985). Éstas también pueden ser empleadas para diferenciar cepas patogénicas de

Trypanosoma cruzi, así como para la caracterización de receptores de membrana en otras bacterias y otros protozoarios (De Miranda y Pereira, 1984).

Las lectinas vegetales constituyen un grupo muy heterogéneo de glicoproteínas capaces de reconocer y unirse específicamente a ciertos carbohidratos (Poretz et al., 1986). Las lectinas de leguminosas han sido localizadas principalmente en semillas, aunque también se han descrito en tejidos vegetativos. Estas moléculas al parecer se desempeñarían como proteínas de reserva y de defensa (Etzler, 1986).

Las funciones específicas de las lectinas vegetativas aún no están muy claras, pero podrían estar implicadas en las interacciones simbióticas entre plantas y microorganismos o estar relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, el empaquetamiento de las proteínas de reserva, la defensa vegetal o el estrés fisiológico (Shewry et al., 1995).

La amplia aplicabilidad de las lectinas ha hecho de que estas moléculas se conviertan en instrumentos valiosos para la medicina y la industria. La disponibilidad de un gran número de lectinas con diferentes especificidades para carbohidratos ha conllevado a su amplio empleo como reactivos para estudiar carbohidratos simples y complejos, en solución y sobre superficies celulares (Lis y Sharon, 1986). Estas moléculas han sido empleadas también como agentes mitogénicos (Kolberg y Sletten, 1982).

Debido a la facilidad con que interactúan con las membranas de los liposomas es que se les ha considerado como excelentes mediadores de sistemas transportadores de drogas, ya que demostraron la capacidad de permitir una liberación más gradual de los fármacos en sitios específicos. Cuando se encuentran unidas a la membrana celular actúan como receptores para ligandos fisiológicos, así como en los procesos de adhesión a través del reconocimiento de carbohidratos específicos localizados en células adyacentes (Nicholls y Mulley, 1982).

Gracias a estas características es que las lectinas se han transformado en una segunda generación de mucoadhesivos. Recientes estudios también han descrito el gran potencial de las lectinas para poder anclar liposomas en las superficies celulares, prolongando el período de liberación de drogas en el interior del tracto gastrointestinal (Lis y Sharon, 1986).

Debido a la afinidad de las lectinas por las células neoplásicas es que vienen siendo utilizadas como marcadores celulares en transformaciones neoplásicas, así como también en la caracterización morfológica de la microvasculatura de carcinomas humanos, el reconocimiento de células capilares endoteliales y sus procesos durante la angiogénesis (Peumans et al., 2001).

1.6 La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)

La quinua es una planta C₃ de apariencia herbácea, ciclo anual y reproducción autógena (Bertero et al., 1999; Wilson, 1988), la cual tiene un $2n = 36$ cromosomas constituyendo una especie alotetraploide perteneciente a la familia Chenopodiaceae (Orden: Centrospermales) (Gandarillas y Luizaga, 1969); siendo una especie con una amplia distribución geográfica fue utilizada como alimento desde tiempos preincaicos tal como lo refieren ciertas evidencias arqueológicas encontradas en la cerámica de la cultura Tiahuanaco.

Se calcula que su domesticación ocurrió hace más de 7 000 años A.C., siendo su pariente más cercano *Ch. hircinum*, presentando una enorme variación y plasticidad genética para adaptarse a diferentes condiciones ambientales; se la cultiva desde los 0 - 4 000 metros sobre el nivel del mar, desde zonas áridas hasta zonas húmedas y tropicales, desde zonas frías hasta zonas templadas y cálidas. Es muy tolerante a los factores abióticos adversos como son la sequía, la helada, la salinidad y otros tipos de estrés que afectan a las plantas cultivadas. Su período vegetativo varía desde los 90 a 240 días, crece con precipitaciones que van desde 200 a 2 600 mm anuales, se adapta a suelos ácidos de pH 4,5 hasta alcalinos con pH de 9,0. Sus semillas germinan hasta con 59 mmhos/cm de concentración salina y se adapta a diferentes tipos de suelo desde arenosos hasta arcillosos (Mujica, 1997).

La semilla está constituida por: el episperma, la cual está compuesta por cuatro capas, en donde la capa externa contiene la saponina (glucósido) que le da el sabor amargo al grano (Villacorta y Talavera, 1976); el embrión, que constituye el 30 % del volumen total de la semilla, en ella se encuentra la mayor cantidad de proteína (35 - 40 %) a comparación del perisperma que sólo representa el 6,3 - 8,3 % de la proteína total del grano (Ayala, 1977); y el perisperma, principal tejido de almacenamiento (almidón), representando el 60 % de la superficie de la semilla (Prego et al., 1998). Asimismo, es importante indicar que la quinua es rica en

aminoácidos esenciales tales como lisina (7,36 %), treonina (4,51 %) y metionina (2,20 %), los cuales son escasos en cereales y leguminosas; vitaminas (A, B2 y E); minerales (calcio, hierro, cobre y zinc) y ácidos grasos insaturados (ácido linoleico, 54 %; ácido oleico, 22%; y ácido linolénico, 7 %) (Coulter y Lorenz, 1990; Prakash et al., 1993; Ranhotra et al., 1993; Ruales y Nair, 1993).

Respecto a estudios realizados sobre lectinas aisladas de quinua se ha reportado la presencia de una CqLec de 29 kDa. que es glicosilada, donde las pruebas de hemaglutinación revelaron que aglutinaba fuertemente eritrocitos del grupo sanguíneo AB, siendo esta actividad inhibida preferencialmente por glucosa y manosa. Asimismo, el análisis completo de aminoácidos mostró una elevada concentración de Phe, Asp y Pro mientras que una muy baja concentración correspondiente a Met, Tyr, His y Lys. De otro lado, el análisis del extremo N-terminal (GQVSGQQVLNFGN...) mostró que tenía homología secuencial con otras lectinas específicas de manosa (Jiro et al., 2002). Por otra parte, se ha demostrado que es una lectina resistente a variaciones de temperatura y pH; no presentando actividad mitogénica sobre linfocitos T, pero sí la capacidad de integrarse a los liposomas constituyendo una valiosa herramienta para la liberación progresiva de drogas frente a células cancerosas (Portugal et al., 2002).

Finalmente, al evaluar el efecto perjudicial de las lectinas en la alimentación humana y animal, se encontró que la quinua poseía lectina que no era dañina para la salud al igual que en otras especies vegetales tales como: *Abelmoschus esculentus*, *Delonix regia*, *Phaseolus calcaratus*, *Phaseolus lathyroides*, *Parkia biglandulosa*, *Papaver somniferum*, *Sesbania arabica*, *Terminalia catappa*, *Vigna sinensis* y *Voandzeia subterranea* (Grant et al, 1991). Esto da conocer mediante el estado de arte el bagaje teórico e histórico de las variables, temas o unidades de estudio. Se debe dar a conocer la información con mayor profundidad citando las fuentes de información (aplique las citas textuales y las no textuales).

CAPITULO II

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA Y MARCO METODOLÓGICO

2.1. Descripción de problema

La lucha contra las plagas y enfermedades, que afectan los cultivos agrícolas y forestales, es un problema preocupante para el hombre. Tradicionalmente y aún en la actualidad, el empleo de plaguicidas químicos ha permitido de forma relativamente rápida y efectiva eliminar estos problemas. Sin embargo, esta efectividad está unida a una serie de efectos desfavorables como son: afectaciones sobre la fauna beneficiosa, contaminación ambiental y el desarrollo acelerado de resistencia de los insectos a los insecticidas (Ceccatti, 2004).

Así, varios autores han buscado una alternativa de solución entre las que se encontraría las lectinas, que actuarían como proteínas de defensa vegetal contra fitopatógenos, ya que pueden reconocer y ligarse a glicoconjugados presentes en la superficie de hongos, bacterias y membrana peritrófica de insectos, procediendo a “aglutinarlos”. Además ellas poseen una gran afinidad por oligosacáridos, que raramente se encuentran en las plantas o están totalmente ausentes en tejidos vegetales (Peumans y Van Damme, 1995), lo cual ha conllevado a que se las utilice como proteínas de diagnóstico microbiológico (Schalla et al., 1985), permitiendo la diferenciación de cepas bacterianas patógenas; e incluso en la determinación específica de grupos sanguíneos, como es el caso de la lectina aislada a partir de semilla de *Dolichos biflorus* que aglutina eritrocitos A₁ (Olsson y Chester, 2001).

Así mismo, la ingeniería genética vegetal actualmente ofrece la oportunidad de que una planta sea capaz de producir resistencia a insectos, a través de la inserción y expresión de genes de proteínas enteropatógenicas, por lo cual sería importante determinar la composición aminoacídica y secuencia N-terminal de lectinas y crear una biblioteca cDNA. De otro lado, el desarrollo de recientes investigaciones en Biología Vegetal ha permitido comprender la bioquímica, la fisiología y la biología

molecular de los genes que gobiernan la inducción de resistencia o susceptibilidad de las plantas frente a la patogenicidad y ataque de insectos (Sinclair et al., 2004).

El Perú, al ser un país andino y uno de los principales centros de dispersión (variabilidad genética) y producción de quinua, está en la obligación científica y tecnológica de explotar al máximo todas las cualidades de este producto, sean: nutricionales, fisiológicas, y biotecnológicas; valorizando así este cultivo, especialmente el cultivar Salcedo-INIA que fue obtenida en Puno, la cual es una planta de grano grande, bajo contenido de saponinas y con un rendimiento promedio de 2500 kg/ha, ocupando el séptimo lugar de producción (INIA, 1997).

Es por todas estas razones que, en el presente estudio de investigación, se realizó la determinación de actividad biológica, así como la caracterización bioquímica de la lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA); pues, se sabía además que, no existen trabajos en nuestro medio relacionados con la extracción de este tipo de proteínas que actuarían como mecanismo de defensa vegetal contra insectos y como herramienta de diagnóstico microbiológico.

2.2 Objetivos de investigación

Objetivo general:

- Aislar, purificar, determinar la actividad biológica y caracterizar bioquímicamente la lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA).

Objetivos específicos

- Aislar lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA) a través de extracción salina, cromatografía en Sephadex G-100 y Sephadex G-75.
- Purificar lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA) por cromatografía HPLC.
- Determinar actividad biológica de la lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA) a través de pruebas de hemaglutinación, prueba bactoaglutinante y actividad insecticida.
- Caracterizar bioquímicamente la lectina de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. (cv. Salcedo-INIA) a través de análisis de composición de

aminoácidos por el sistema PICO-TAG y determinación de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal.

2.3 Método, diseño y tipo de investigación

Experimental, cuantitativo y prospectivo

2.4 Cuadro de variables, temas o unidades de investigación

| Variable Independiente | Indicador | Valor |
|-------------------------------|--|----------------------------|
| Lectina de quinua | Caracterización molecular | Composición de aminoácidos |
| | Peso molecular | kiloDaltons |
| Dependiente | | |
| Hemaglutinación | Hemaglutinación de eritrocitos | µg/ml |
| | Inhibición de actividad hemaglutinante por carbohidratos | mM |
| | Inhibición de actividad hemaglutinante por agentes quelantes | mM |
| Bactoaglutinación | Actividad de bactoaglutinación | Positiva Negativa |
| Insecticida | Número de horas de muerte del insecto | Hora |

2.5 Técnicas e instrumentos de investigación

Técnica: Experimental

Instrumento: Observación

2.6 Procedimientos de investigación

2.6.1 Material biológico

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo durante los meses de julio a diciembre del año 2003, para lo cual se emplearon semillas de *Chenopodium quinoa* Willd. cv. Salcedo-INIA, con una pureza varietal del 98 % siendo cedidas por la Estación Experimental Illpa-INIA del Departamento de Puno (Anexo 1).

2.6.2 Reactivos y equipos

Las actividades, así como los equipos empleados en el presente trabajo de investigación fueron compartidos entre el laboratorio de Química Biológica del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa (UNSA), bajo la dirección del M. Sc. Ronald Navarro Oviedo, donde se hizo la extracción salina, la cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100 y G-75, el SDS-PAGE, la prueba de hemaglutinación, la prueba de bactoaglutinación y la prueba de actividad insecticida; y el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad del Estado de Campinas-SP (UNICAMP-SP) del Brasil, bajo la supervisión y colaboración del Dr. Luis Alberto Ponce Soto, donde se realizó la HPLC-FR, el análisis de aminoácidos y la determinación de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal.

Los reactivos utilizados en la extracción salina provinieron de Merck (Merck Damstadt, Germany); para la cromatografía de exclusión molecular se obtuvieron de Aldrich (Aldrich Chemical Co. Inc. Wisconsin, USA); para el HPLC-FR y análisis completo de aminoácidos se compraron de Waters (Waters System, USA); para el SDS-PAGE se emplearon de Bio-Rad (Bio Rad Laboratories - California, USA); para la determinación de la secuencia N-terminal provinieron de Applied Biosystems (Applied Biosystems - Perkin Elmer Division, USA); y para las pruebas de hemaglutinación, bactoaglutinación y actividad insecticida a partir de Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, USA), Difco (Difco Laboratories - Michigan, USA) y Pierce (Pierce Chemical Company - Illinois, USA).

2.6.3 Extracción salina

De acuerdo al método de Vilarrubia et al. (1995), 100 g de semillas enteras fueron trituradas en un molino de café hasta la obtención 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 beaker de 500 ml de capacidad. La mezcla resultante fue mantenida en agitación manual por 1 hora a temperatura ambiente, para obtener la solubilización de las proteínas. Posteriormente la suspensión obtenida fue filtrada en gaza, a fin de retirar las partículas grandes y material insoluble, y centrifugada a 3000 x g por 20 minutos a 4 °C. El precipitado se descartó y el sobrenadante (120 ml) obtenido fue dializado frente a 1 litro de tampón bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) 0,1 M, pH 8,0, por espacio de 6 horas

(realizándose cambios cada 2 horas) con la ayuda de un agitador magnético tipo LE305, al final del cual se eliminó toda la sal lo que fue determinado por medio de una reacción con unas gotas de nitrato de plata (AgNO_3) 0,01 N que en caso de ser positiva (presencia de NaCl) adquiriría una coloración lechosa. Inmediatamente después, de esta solución dializada se tomaron dos alícuotas de 0,1 ml para la determinación de proteínas por el método de Biuret (Anexo 2) y para la prueba de hemaglutinación con eritrocitos humanos. El dializado fue conservado a 4 °C.

2.6.4 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100

Según Toyama et al. (2001) 25 ml de muestra de la etapa anterior fueron colocados en una columna de exclusión molecular empacada con Sephadex G-100 (1,6 x 100 cm). La columna fue equilibrada previamente con 400 ml de tampón bicarbonato de amonio 0,1 M a pH 8,0. La muestra fue eluida con el mismo tampón y colectada a un flujo constante de 12 ml/h, a razón de 3 ml/tubo, en un colector automático Foxy 200. El monitoreo de la corrida cromatográfica fue realizado en un fotolorímetro Klett Summerson a 540 nm, en la que para cada una de las fracciones se cuantificó la concentración de proteínas y realizó la prueba de hemaglutinación. Las fracciones con actividad hemaglutinante fueron mezcladas para formar un “pool”.

2.6.5 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75

De acuerdo a Toyama et al. (2001), la muestra de la etapa anterior (126 ml) fue aplicada a una columna de gel filtración empaquetada con Sephadex G75 (1,9 x 102 cm). La columna fue equilibrada con 580 ml de tampón Tris-HCl 50 mM / NaCl 150 mM a pH 8,0. La muestra fue eluida con el mismo tampón a un flujo constante de 12 ml/h y colectada en un colector automático Foxy 200. El monitoreo de la corrida cromatográfica también fue realizado en un fotolorímetro Klett Summerson a 540 nm, en la que para cada una de las fracciones se cuantificó la concentración de proteínas y realizó la prueba de hemaglutinación. Las fracciones con actividad hemaglutinante fueron mezcladas para formar un “pool”.

2.6.6 Cromatografía HPLC de fase reversa

Según Freire et al. (2001a), 20 mg de la fracción con actividad hemaglutinante y de afinidad por carbohidratos de la etapa anterior fue repurificada en una columna μ -Bondapack C18 (0,78 x 30 cm) preparativa, previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0,1 % a pH 3,5 (Tampón A), acoplada a un sistema de HPLC de fase

reversa. El sistema cromatográfico empleado fue el HPLC-PDA 991 (Waters) equipado con dos bombas (Waters) modelo 510/B y un inyector automático de muestras U6K con un asa de 2,0 ml de capacidad. Inicialmente la elución 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.

2.6.7 Electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970).

Las placas de poliacrilamida fueron hechas de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas fueron preparadas utilizando una solución stock de acrilamida (30 % T; 0,8 % C). El gel de concentración a 5 % se preparó utilizando tampón Tris-HCl 0,5 M de pH 6,8, mientras que el gel de corrida se preparó utilizando tampón Tris-HCl 1 M de pH 6,8. A ambos geles se les agregó SDS al 20 % en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 0,5 % (v/v).

La electroforesis SDS-PAGE fue realizada en un sistema doble de microplacas SE 250 Mighty-Small II (Hoefer Scientific Instruments). Las muestras y marcadores de masa molecular (lactoalbúmina, 14,4 kDa; inhibidor de tripsina, 20,1 kDa; anhidrasa carbónica, 30,0 kDa; ovoalbúmina, 43,0 kDa; albúmina, 67,0 kDa y fosforilasa b, 94,0 kDa) fueron disueltos en el tampón de muestra (Tris HCl 0,075 M, pH 6,8; glicerol 10 %; SDS 4 % y Bromofenol 0,001 %). La corrida electroforética fue llevada a cabo a 30 mA. El gel fue coloreado con una solución de Comassie Blue 0,05 % a 37 °C, y el exceso de colorante fue removido con ácido acético al 7 %.

2.6.8 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, todo factor Rhesus positivo (Rh⁺). La sangre fue recolectada y mantenida en una solución de Alsever (2,05 g de glucosa, 0,80 g de citrato de sodio y 0,42 g de cloruro de sodio para 100 ml de agua destilada, a pH 6,1 ajustado con ácido cítrico) a 4 °C hasta su uso.

Tripsinización de eritrocitos

La tripsinización de eritrocitos fue realizado según el método de Sharon y Lis (1972). Los eritrocitos fueron colectados y centrifugados a temperatura ambiente en centrífuga de mesa (Excelsa 3 Fanem SA) a $450 \times g$ por 10 minutos. El sedimento celular fue entonces lavado de 3 a 4 veces con NaCl 0,15 M, en una proporción de 5 ml de NaCl por cada 1 ml de eritrocitos sedimentados.

Por cada 4 ml de eritrocitos lavados se adicionó 100 ml de PBS (0,8 g de NaCl; 0,02 g de KCl; 0,17 g de Na_2HPO_4 y 0,02 g de KH_2PO_4 , para 100 ml de agua), dando lugar a una suspensión celular de absorbancia de 2,0 a 620 nm. A cada diez partes de esta suspensión se adicionó una parte de tripsina 1 % (p/v), dejándose incubar a 37 °C por 1 hora.

Los eritrocitos tripsinizados fueron entonces de nuevo lavados de 4 a 5 veces con NaCl 0,15 M. Finalmente fueron resuspendidos en suficiente tampón CTBS (Tris-HCl 20 mM / NaCl 150 mM, pH 7,5, conteniendo CaCl_2 5 mM) para obtener una suspensión patrón de eritrocitos al 3 % (v/v) (Pereira et al., 2001).

Actividad hemaglutinante

Según lo descrito por Carvalho et al. (1998), para la determinación de la actividad hemaglutinante de las lectinas de *Ch. quinoa* Willd. cv. Salcedo-INIA fueron utilizadas placas de microtitulación de 96 pozos (Sigma Chemical Co., USA). A cada pozo inicial de la primera columna se adicionó 50 μl de CTBS y de ahí 50 μl de la lectina purificada. A continuación, se realizó la dilución seriada en una misma fila, mezclando y transfiriendo 50 μl para el pozo siguiente hasta la penúltima columna. Los últimos pozos de cada fila no contenían muestra, sino solo una suspensión de eritrocitos los cuales fueron considerados como controles negativos.

Terminadas las diluciones, a cada pozo se adicionó 50 μl de la suspensión de eritrocitos al 3 % (v/v). Las evaluaciones fueron llevadas a cabo a las 2 horas de incubación de la placa a temperatura ambiente. La concentración mínima hemaglutinante de la lectina permitió la visualización de una capa de eritrocitos aglutinados.

Prueba de inhibición de la actividad hemaglutinante por carbohidratos

De acuerdo a lo señalado por Carvalho et al. (1998), la inhibición de la actividad hemaglutinante por diversos carbohidratos fueron realizados con D-fucosa, D-galactosa, D-rafinosa, D-glucosa, D-sacarosa, D-maltosa, D-fructosa, D-galactosamina y D-glucosamina adquiridos de Sigma Co., USA.

En las placas de microtitulación (96 pozos, Sigma Co., USA) a los pozos iniciales de la primera columna se adicionó 25 µl de CTBS y 25 µl del carbohidrato correspondiente. De ahí, se procedió a realizar una dilución seriada en la misma fila para obtener concentraciones que variaron desde 200 hasta 0,39 mM para cada carbohidrato. Seguidamente se agregó 25 µl de la lectina de tal modo que alcanzara una concentración final de 4,0 µg/ml en cada pozo. Las placas se mantuvieron en reposo por 5 minutos, para luego adicionarles 50 µl de una suspensión al 3 % (v/v) de eritrocitos tripsinizados del grupo O Rh⁺.

Después del reposo de las placas a temperatura ambiente por 2 horas, se determinó la menor concentración de carbohidrato capaz de inhibir la aglutinación inducida por 4,0 µg/ml de lectina sobre eritrocitos tripsinizados del grupo O Rh⁺. Los controles negativos (sin inhibición) constaron de 50 µl de lectina y 50 µl de suspensión celular, y los positivos (con inhibición) de 50 µl de solución de carbohidrato y 50 µl de suspensión celular.

Prueba de inhibición de la actividad hemaglutinante por agentes quelantes

Según Carvalho et al. (1998), para la inhibición de la actividad hemaglutinante por agentes quelantes se emplearon EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) y EGTA (ácido etilenglicol bis [β-aminoetil éter] N, N' tetraacético) los cuales fueron adquiridos de Sigma Co., USA.

En las placas de microtitulación (96 pozos, Sigma Co., USA) a los pozos iniciales de la primera columna se adicionó 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. Seguidamente, se agregó 25 µl de la lectina de tal modo que alcanzara una concentración final de 4,0 µg/ml en cada pozo. Las placas se mantuvieron en reposo por 5 minutos a temperatura

ambiente, para enseguida adicionarles 50 µl de una suspensión al 3 % (v/v) de eritrocitos tripsinizados del grupo O Rh⁺.

Después del reposo de las placas a temperatura ambiente por 2 horas, se determinó la menor concentración de agente quelante capaz de inhibir la aglutinación inducida por 4,0 µg/ml de lectina, sobre eritrocitos tripsinizados del grupo O Rh⁺. Los controles negativos (sin inhibición) constaron de 50 µl de lectina y 50 µl de suspensión celular, y los positivos (con inhibición) de 50 µl de solución de agente quelante y 50 µl de suspensión celular.

2.5.9 Prueba de bactoaglutinación

Todos los medios de cultivo microbiológico empleados en este estudio fueron comprados de Difco. Las cepas bacterianas empleadas para la prueba de bactoaglutinación fueron las siguientes: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Éstas fueron aisladas de muestras clínicas tales como orina, heces y secreción faríngea de personas que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General Goyeneche de Arequipa. En primer lugar, se realizó la coloración de Gram de las muestras fijadas (por calor) en el portaobjetos para determinar si se trataban de bacterias Gram positivas o Gram negativas. Seguidamente, se realizó la siembra primaria del inóculo respectivo por el método del estriado (zig - zag) sobre placas Petri (20 x 100 mm, Pyrex) conteniendo 25 ml de medio de cultivo como agar Mc Conkey, agar Xilosa Lisina Desoxicolato (para bacterias Gram negativas) y Agar Sangre (para bacterias Gram positivas). Las placas sembradas fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

De ahí, se procedió a realizar las respectivas pruebas de diferenciación bioquímica para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* sobre medio Triple Azúcar Hierro (TSI), medio Agar Lisina Hierro (LIA) y medio Citrato de Simmons (CS). Éstas como en el caso anterior fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Una vez caracterizadas las cepas bacterianas, éstas fueron repicadas sobre Agar Soja Tripticasa (TSA), incubadas en las mismas condiciones antes señaladas y almacenadas a 4 °C.

Para realizar las suspensiones bacterianas primero se disolvieron unas 2 a 3 colonias bacterianas en 2 ml de NaCl 0,9 % dentro de un frasquito de 5 ml,

ajustándolas después a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (0,5 en la escala nefelométrica de Mc Farland).

En la determinación de la actividad bactoaglutinante de la lectina se siguió la metodología descrita por Guinée et al. (1972), para lo cual se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos (Sigma Chemical Co., USA). A cada pozo inicial de la primera columna se adicionó 50 μ l de CTBS más 50 μ l de la lectina. A continuación, se realizó una dilución seriada en la misma fila transfiriendo 50 μ l para el pozo siguiente hasta la penúltima columna. Los últimos pozos de cada fila no contenían lectina, pero si una suspensión de bacterias las cuales fueron considerados como controles negativos.

Terminadas las diluciones a cada pozo se agregó 50 μ l de la suspensión bacteriana ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml), teñidas con violeta de genciana al 0,005 %. Las lecturas fueron llevadas a cabo a las 2 horas de incubación a 37 °C. La concentración mínima bactoaglutinante de lectina permitió la visualización de una capa de bacterias aglutinadas.

2.6.10 Prueba de actividad insecticida

Para la determinación de la capacidad insecticida de la lectina se siguió el método descrito por Alvarez et al. (1996). Se emplearon larvas de *Symmetrischema plaesiosema* (Gelechiidae), de segundo estadio (9 mm), las cuales fueron obtenidas a partir de tubérculos de papa. Éstas una vez colectadas fueron colocadas sobre rodajas de papa de 4,0 x 0,5 cm dentro de pequeños recipientes de vidrio (Pyrex), los cuales fueron cubiertos con plástico (PlasticWrap) transparente. Las larvas fueron sometidas a distintas concentraciones (1000, 500, 250, 125 ppm) de lectina purificada para lo cual éstas fueron colocadas por 15 segundos en 5 ml de cada uno de los tratamientos mencionados, siendo 9 las larvas que se asignaron por cada tratamiento. Finalmente, en todas ellas se evaluó el número de horas que fueron necesarias para que las larvas murieran.

2.6.11 Análisis de composición de aminoácidos

El análisis de aminoácidos fue realizado en un analizador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema Waters). La identificación de los aminoácidos fue realizada a través de una cromatografía HPLC del producto feniltiocarbamil del aminoácido, proveniente de la derivatización con fenilisotiocianato de los

aminoácidos obtenidos por hidrólisis ácida. Esta forma de cromóforos puede ser detectada en concentraciones de 1 pmol, según la metodología descrita por Henrikson y Meredith (1984).

Preparación de la muestra

Solubilización

De acuerdo a Toyama et al. (2001), se disolvieron 300 µg de la muestra en 50 µl de Tampón B (acetonitrilo 66 % + TFA 0,025 %) de HPLC (Waters). A continuación, se centrifugó a 200 x *g* por 15 minutos y la suspensión resultante se dividió en 2 alícuotas de 25 µl cada una, las cuales posteriormente fueron secadas con la ayuda del work station (deseCADador-liofilizador con barómetro acoplado) a una presión de 65 militorr.

Hidrólisis ácida

Posteriormente, según lo descrito por Toyama et al. (2001), las muestras (por duplicado) de 25 µl cada una, fueron colocadas dentro del frasco de reacción que contenía 100 µl de una solución de HCl 6N y 1 mg/ml de fenol para evitar la formación de clorotirosina. Enseguida se procedió a generar un vacío de 1-2 torr, hasta el inicio de burbujeo del HCl. Creado el vacío, se dejó entrar nitrógeno (SS-ultra puro) por 5 segundos. Esta etapa fue repetida por tres veces. A continuación, se removió la tapa del frasco de reacción y se elevó la temperatura a 105 °C para ejecutar la hidrólisis durante 24 horas. Después de este período, el tubo de reacción fue colocado en vacío hasta 65 militorr para secar la muestra hidrolizada.

Derivatización

Según Toyama et al. (2001) a la muestra se le adicionó 20 µl de una mezcla de metanol, agua y trietilamina en una proporción de 2:2:1. Cada tubo fue agitado, centrifugado a 250 x *g* por 15 minutos y colocado en vacío hasta una presión de 65 militorr para su evaporación. Este procedimiento removió las sales y los solventes adsorbidos por los aminoácidos. A continuación, se preparó una solución fresca de derivatización compuesta de metanol, trietilamina, agua y fenilisotiocianato (PITC), en una proporción 7:1:1:1 (v/v), siendo luego adicionados 20 µl a cada tubo de reacción y dejados a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de la derivatización, la muestra fue secada al vacío a 50 militorr, hasta completar la

remoción de todo el PITC. La muestra fue disuelta en 50 μ l de una solución 0,4 mM de tampón fosfato de sodio conteniendo 5 % de acetonitrilo.

El análisis de aminoácidos-PITC fue realizado en HPLC, empleando una columna μ -Bondapack C-18 de fase reversa, con un gradiente lineal desde 0 a 100 % de acetonitrilo 60 % (tampón B) por 21 minutos. La identificación de cada aminoácido fue realizada en relación a una corrida patrón de aminoácidos-PITC (Bidlingmeyer et al., 1984). Para la cuantificación de cisteína y metionina, las muestras fueron previamente oxidadas con ácido perbórmico. La hidrólisis y la derivatización de las muestras oxidadas también siguieron la metodología antes descrita.

Determinación de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal

40 nmoles de la muestra reducida con DTT 1 M fueron colocados en el secuenciador automático modelo 477 de la Applied Biosystem para la determinación de la secuencia de aminoácidos de la porción amino terminal de la muestra obtenida por HPLC (Carvalho et al., 1998).

Degradación automática de Edman

Este método fue utilizado para la determinación de la porción N-terminal de la muestra. El secuenciador automático usa la técnica de la degradación de Edman (Edman y Begg, 1967) para remover e identificar aminoácidos a partir de la porción N-terminal de un polipéptido. Después de la activación de un filtro compuesto de papel y fibra de vidrio, la proteína es covalentemente unida a este soporte y enseguida colocada en la cámara de reacción. Después de cada ciclo degradativo, el aminoácido N-terminal es removido de la cadena lateral en forma de un derivado más estable, como la feniltiohidantoína (PTH) del aminoácido correspondiente. El PTH-aminoácido es entonces transferido hacia un sistema de cromatografía líquida de alta presión donde la identificación es realizada por comparación con un patrón cromatográfico de PTH- aminoácidos.

Los reactivos y el tampón fueron transferidos hacia la cámara de reacción y conversión por control automático a través de un microprocesador, permitiendo la determinación automática de las secuencias con una sensibilidad de 10 hasta 500 picomoles de proteína. Los reactivos empleados fueron: R1: 5 % de fenilisotiocianato (PITC) en n-heptano; R2: 12,5 % de trimetilamina (TMA) en agua; R3: ácido trifluoroacético (TFA) con 0,002 % de ditiotreitól (DTT); R4: 25 %

de TFA con 0,01 % de DTT; R5: acetonitrilo con 0,001 % de DTT; S1: n-heptano; S2: etilacetato; S3: 1-clorobutano; S4: acetonitrilo 20 %.

Estudio de homología secuencial en la región N-terminal

El grado de homología secuencial de la región N-terminal correspondiente a CqLEC (lectina de *Chenopodium quinoa* cv. Salcedo-INIA) fue investigada en relación con la secuencia aminoacídica de otras lectinas vegetales, empleando el siguiente servidor electrónico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Este servidor brinda acceso directo a SWISS-PROT, que es producto de una colaboración entre el Instituto Suizo de Bioinformática y la Estación del Instituto de Bioinformática Europeo EMBL, estando disponible la entrada original en <http://www.ebi.ac.uk/sprot>.

2.6.12 Análisis estadístico

Todos los datos son el promedio de 3 observaciones los cuales fueron procesados adecuadamente con el software *STATISTICA V. 6,0*. Se aplicó regresión semilogarítmica para calcular la masa molecular de la CqLEC, un diseño completamente randomizado con ANOVA y la prueba de Tukey para evaluar el efecto insecticida de la CqLEC sobre larvas de *S. plaesiosema*, y regresión-correlación lineal para calcular el factor de calibración de proteínas. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de significancia del 95 % ($P < 0,05$).

2.7 Consideraciones éticas

El material biológico empleado como es la quinua, eritrocitos, microorganismos e insectos fueron recolectados siguiendo protocolos estándar sin afectación a las personas o el ambiente

CAPÍTULO III

EXPOSICIÓN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

3.1 Exposición resultados

3.1.1 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-100

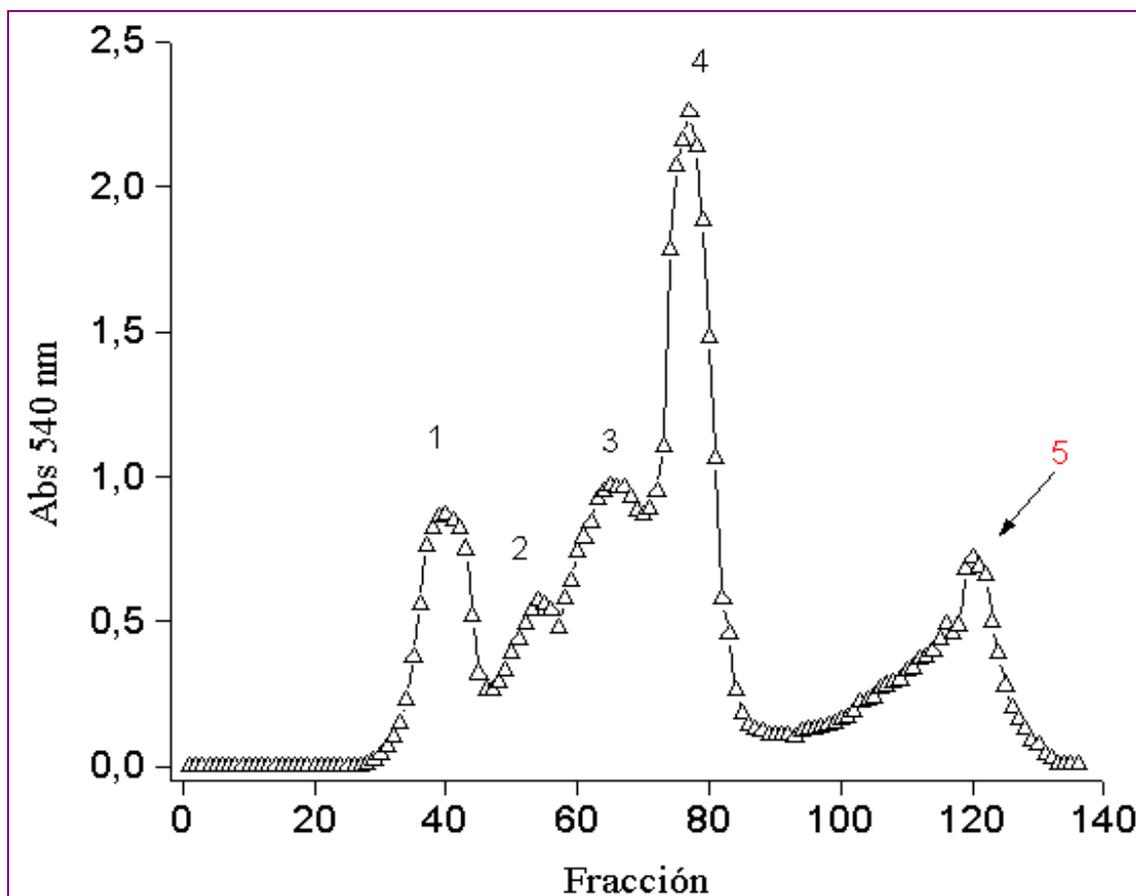
El sobrenadante dializado proveniente de la extracción salina de 70 g de harina de semillas de Ch. quinoa cv. Salcedo-INIA fue purificado a través de una columna cromatográfica de Sephadex G-100, equilibrada y luego eluida con tampón bicarbonato de amonio 0,1 M a pH 8,0.

El perfil cromatográfico (Figura 1) presenta cinco picos. El pico 1 alcanzó una absorbancia máxima de 0,865 en la fracción 40, mientras que los picos 2, 3, 4 y 5 presentaron absorbancias máximas de 0,570, 0,970, 2,260 y 0,720 correspondientes a las fracciones 54, 65, 77 y 120, respectivamente. Asimismo, se puede observar que los picos 1 y 2 corresponden a proteínas con elevado peso molecular, los picos 3 y 4 a proteínas con mediano peso molecular y el pico 5 a proteínas con bajo peso molecular. Esto se debe a que las proteínas más pesadas fueron eluidas por acción del solvente entre las cuentas de la matriz de polidextrano, apareciendo más rápidamente en las primeras fracciones; mientras que las proteínas de bajo peso molecular aparecieron al final de las fracciones colectadas, debido a que éstas tuvieron que atravesar los poros de las cuentas dificultando su salida.

Sin embargo, no todos los picos del perfil cromatográfico fueron capaces de presentar actividad hemaglutinante, sólo el pico 5 (fracciones 90-132) fue capaz de aglutinar eritrocitos tripsinizados del sistema ABO presentando 5,75 mg/ml de proteína total (Anexo 3).

Figura 1

Cromatografía de exclusión molecular del extracto salino de semillas de Ch. quinoa cv. Salcedo-INIA sobre Sephadex G-100 (1,6 x 100 cm).



Nota. La muestra fue eluida con tampón bicarbonato de amonio 0,1 M (pH 8,0) a un flujo constante de 12 ml/h colectándose fracciones de 3 ml/tubo. La absorbancia de las fracciones fue monitoreada a 540 nm. El pico 5 fue el único de todos los picos que presentó actividad hemaglutinante.

3.1.2 Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-75

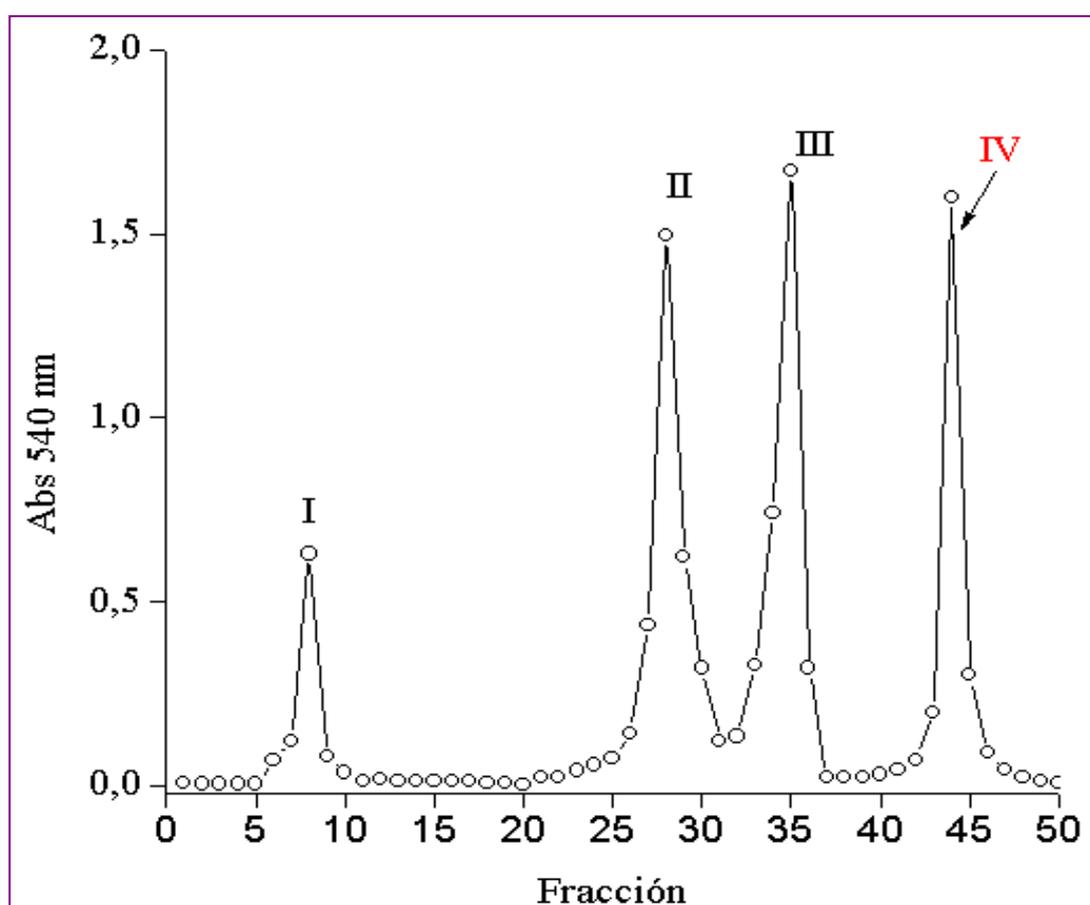
La proteína correspondiente al pico 5, proveniente de la cromatografía en Sephadex G-100, se colocó en una columna de vidrio empacada con Sephadex G-75, previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM/NaCl 150 mM a pH 8,0 y luego eluida con el mismo tampón.

El perfil cromatográfico (Figura 2) presenta cuatro picos, lo cual indica que el pico 5 del paso anterior corresponde a una mezcla de cuatro proteínas que pueden ser separadas haciendo uso de Sephadex G-75. El pico I alcanzó una absorbancia máxima de 0,630 en la fracción 8, mientras que los picos II, III y IV presentaron absorbancias máximas de 1,496, 1,670 y 1,600 correspondientes a las fracciones

28, 35 y 44, respectivamente. Asimismo, se puede observar que los picos I, II y III corresponden a proteínas con un peso molecular relativamente más elevado que el pico IV, lo cual como en el caso anterior (Figura 1) se deduce del hecho que no todas ellas pasarían a la misma velocidad por la matriz de polidextrano, sino que los primeros picos serían resultado de una elución por el espacio entre las cuentas hidratadas de la columna.

Figura 2

Cromatografía de exclusión molecular del pico 5 sobre Sephadex G-75 (1,9 x 10² cm), correspondiente a semillas de Ch. quinoa cv. Salcedo-INIA



Nota. La muestra cual fue eluida con tampón Tris-HCl 50 mM/NaCl 150 mM (pH 8,0) a un flujo de 12 ml/h colectándose fracciones de 3 ml/tubo. La absorbancia de las fracciones fue monitoreada a 540 nm. El pico IV fue el único de todos los picos que presentó actividad hemaglutinante.

Sin embargo, no todos los picos del perfil cromatográfico fueron capaces de presentar actividad hemaglutinante, sólo el pico IV (fracciones 40-48) fue capaz de aglutinar eritrocitos tripsinizados del sistema ABO presentando 5,53 mg/ml de proteína total (Anexo 4).

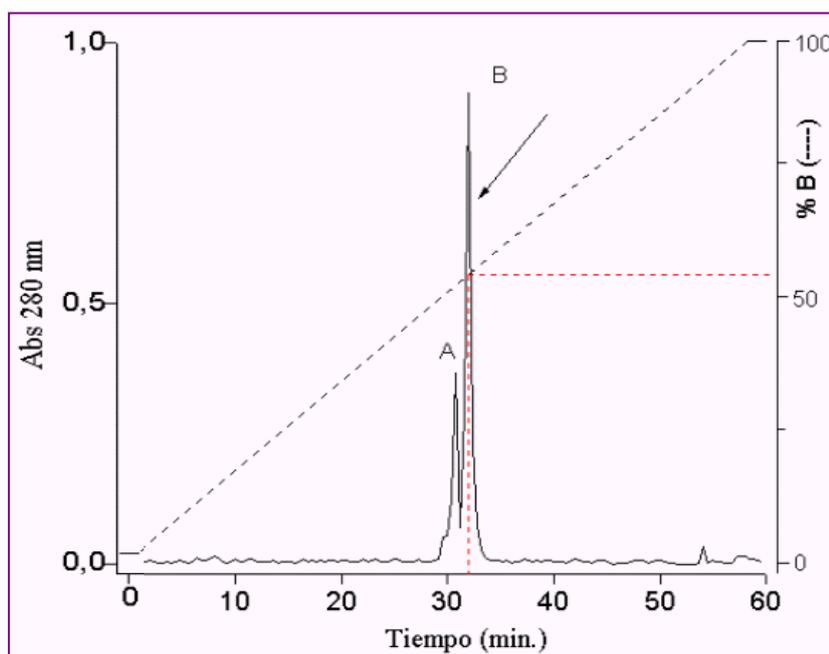
3.1.3 Cromatografía HPLC de fase reversa

La fracción IV correspondiente a la CqLEC fue repurificada en una columna μ -Bondapack C18 preparativa, la cual fue previamente equilibrada con ácido trifluoroacético 0,1 % a pH 3,5 (Tampón A) acoplada a un sistema HPLC de fase reversa, y luego eluida con una gradiente lineal de acetonitrilo 66 % (v/v) (Tampón B).

Como se aprecia en la Figura 3, la cromatografía en HPLC desdobra el pico IV del paso anterior en dos picos. El pico B correspondiente a la CqLEC altamente purificada, presentó una absorbancia máxima de 0,900 (Anexo 5) al ser eluida a los 32 minutos con una concentración de 54 % del tampón B, mientras que el pico A alcanzó una absorbancia máxima de 0,363 a los 30,8 min. Asimismo, la posición del pico B dentro del perfil cromatográfico indica que la CqLEC corresponde a una proteína con una cantidad relativamente alta de aminoácidos hidrofílicos o polares, lo que al parecer indica que ésta tiene una gran superficie de contacto con moléculas de agua, lo cual es importante para su actividad biológica.

Figura 3

Cromatografía HPLC de fase reversa de la fracción IV (CqLEC), en una columna μ -Bondapack C18 (0,78 x 30 cm) preparativa.



Nota. Equilibrada con TFA 0,1 % (Tampón A) y eluida empleando una gradiente lineal de acetonitrilo 66 % (Tampón B). El monitoreo de la corrida se realizó a 280 nm. El pico B correspondió a la CqLEC repurificada.

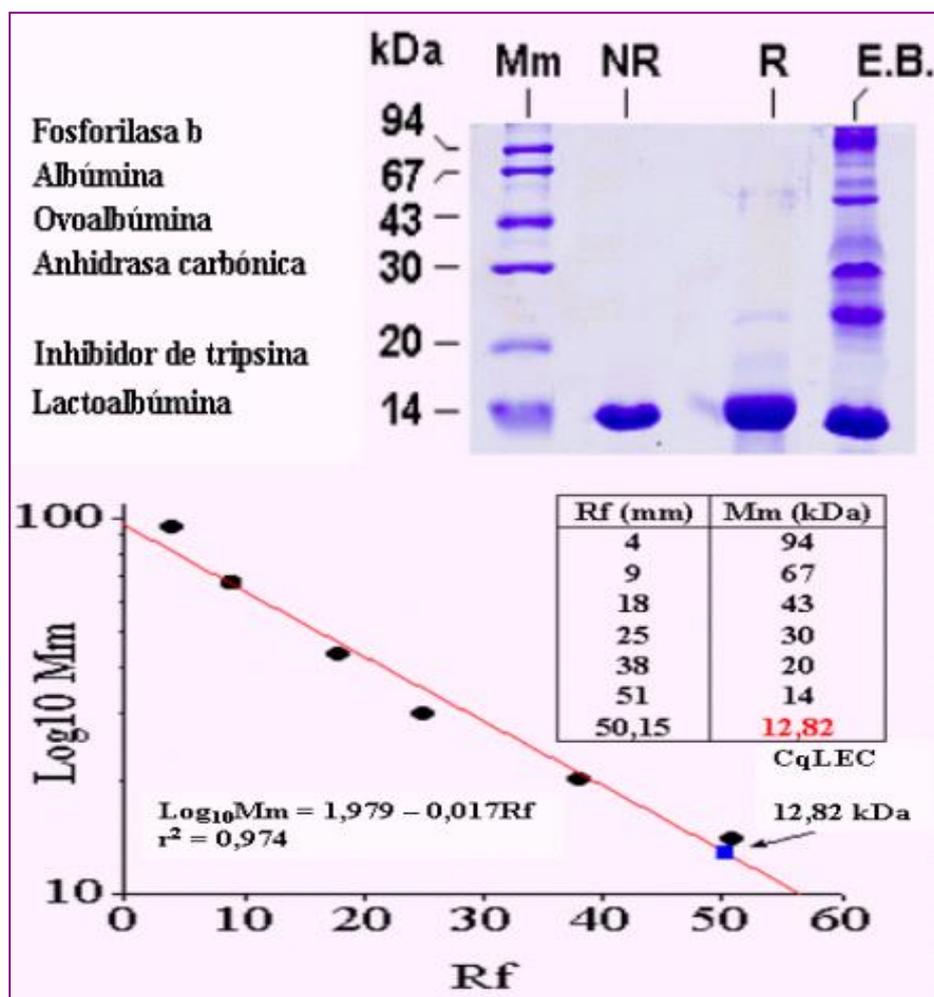
3.1.4 Electroforesis en SDS-PAGE

La corrida electroforética de la proteína del pico B, obtenido en el paso anterior, sobre gel de poliacrilamida (12,5 %) con dodecil sulfato de sodio (SDS) frente a los marcadores proteicos de masa molecular (Figura 4A), indica que la CqLEC corresponde a una proteína de bajo peso molecular (≈ 14 kDa); asimismo, la presencia de una sola banda proteica en los carriles tanto en condiciones normales como en condiciones reducidas (DTT), muestra que la CqLEC está compuesta de una sola cadena polipeptídica y no tiene puentes disulfuro intercadena. Por otro lado, se puede apreciar la homogeneidad y pureza de la lectina obtenida al no encontrarse más que una banda bien coloreada en los carriles NR y R, a diferencia del patrón de proteínas generado por el extracto bruto (EB).

Además, como se puede observar en la Figura 4B, se ha determinado la masa molecular de la CqLEC a través de una regresión semilogarítmica negativa de ecuación $\log_{10}M_m = 1,979 - 0,01R_f$. El valor obtenido corresponde a una masa molecular de $\sim 12,82$ kDa la cual está muy cercana al marcador de lactoalbúmina (14 kDa). De igual modo, un $r^2 = 0,974$, indica que la suma de los cuadrados de las desviaciones del R_f respecto a sus valores estimados se redujo en un 97,4 % al emplear este modelo matemático para predecir la masa molecular de la CqLEC.

Figura 4

Determinación de la masa molecular de CqLEC proveniente de HPLC de fase reversa.



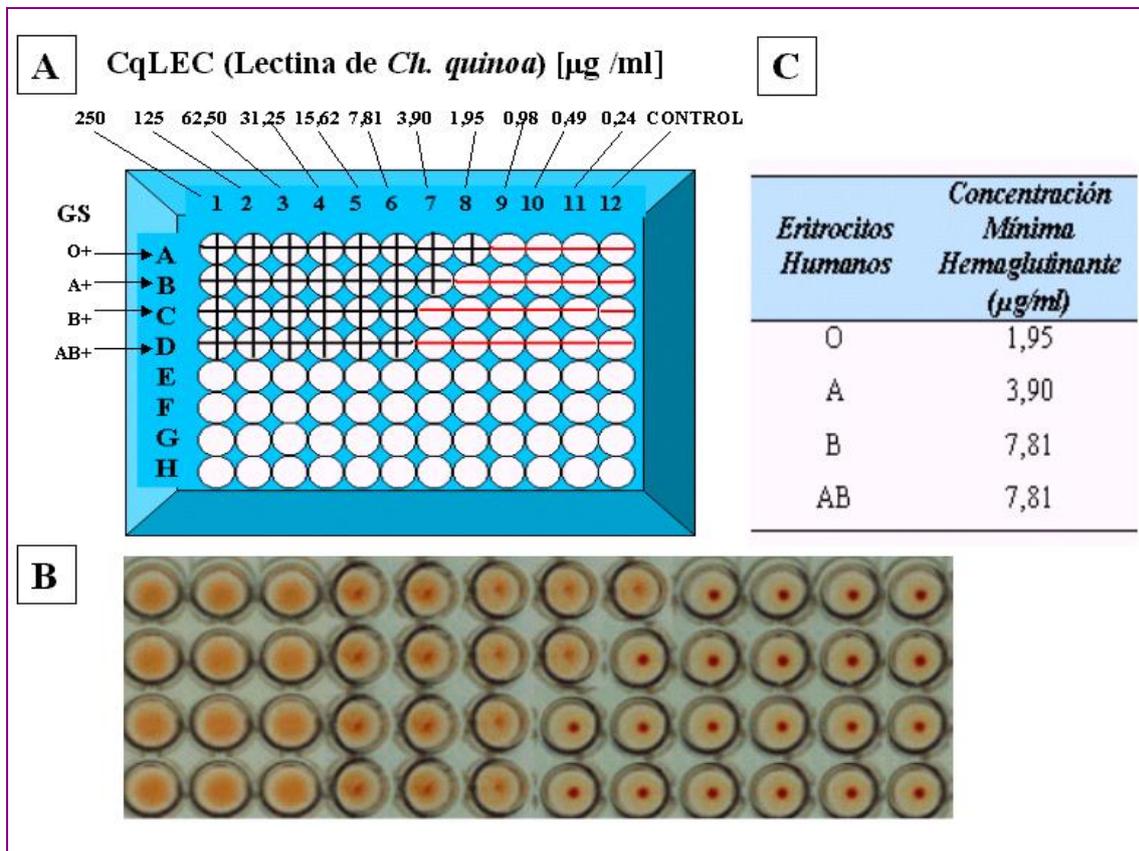
Nota. **A)** Electroforesis sobre gel de poliacrilamida (12,5 %) con SDS, corrido a una intensidad eléctrica de 30 mA y coloreado con Coomassie Blue. **Mm**: carril con los marcadores de masa molecular en kDa; **NR**: carril con la muestra de CqLEC en condiciones no reducidas; **R**: carril con la muestra de CqLEC en condiciones reducidas (DTT 0,1 M); y **EB**: carril con el extracto bruto de proteínas proveniente del extracto salino. **B)** Curva semilogarítmica empleando análisis regresional para determinar la masa molecular relativa de CqLEC. $\text{Log}_{10} \text{Mm}$: Logaritmo de base 10 del marcador de masa molecular en kDa; **Rf**: la distancia recorrida por el marcador en milímetros (mm); y r^2 : el coeficiente de determinación.

3.1.5 Estudio de la actividad hemaglutinante

Como se aprecia en la Figura 5A, se realizaron diluciones seriadas de CqLEC que fluctuaron desde 250 a 0,24 $\mu\text{g/ml}$ para obtener la concentración mínima hemaglutinante (CMH) definida como la cantidad más pequeña de lectina capaz de aglutinar eritrocitos tripsinizados del sistema ABO. La actividad hemaglutinante fue detectada como una película uniforme de eritrocitos (Figura 5B). Este procedimiento ha permitido determinar que la CMH para los eritrocitos del grupo sanguíneo O, A, B y AB (todos Rh⁺) sea de 1,95, 3,90, 7,81 y 7,81 $\mu\text{g/ml}$ de CqLEC, respectivamente (Figura 5C). Es decir, que la CqLEC obtenida es una lectina ligadora de fucosa, pues esta metilpentosa se encuentra como antígeno de superficie, formando parte de la sustancia H que se une a la esfingomielina para formar los glicolípidos, en la membrana de eritrocitos del grupo sanguíneo O. Le siguen en orden de importancia ligadora la N-acetilgalactosamina y la galactosa, que también se encuentran unidas a la membrana de eritrocitos de los grupos sanguíneos A y B, respectivamente. Finalmente, se observó que la CqLEC tiene una escasa afinidad por eritrocitos del grupo sanguíneo AB que expresan N-acetilgalactosamina y galactosa en la membrana eritrocitaria. Cabe indicar que, estos azúcares son determinados por genes alélicos que codifican transferasas específicas.

Figura 5

Prueba de hemaglutinación



Nota. **A)** Representación esquemática del ensayo de hemaglutinación llevada a cabo en una placa de microtitulación con eritrocitos de los grupos sanguíneos del sistema ABO, que muestra la interacción de éstos con diferentes concentraciones de CqLEC ($\mu\text{g/ml}$). Donde, \oplus significa que existe hemaglutinación, mientras que \ominus indica que no existe actividad hemaglutinante. **B)** Fotografía del ensayo de hemaglutinación inducida por CqLEC sobre eritrocitos tripsinizados del sistema ABO, luego de ser incubados a temperatura ambiente durante 2 horas. La formación de una película uniforme de eritrocitos corresponde a una hemaglutinación positiva, mientras que la formación de unos botones rojizos a una hemaglutinación negativa. **C)** Cuadro que muestra la concentración mínima hemaglutinante de CqLEC expresada en $\mu\text{g/ml}$ respecto a los eritrocitos tripsinizados del sistema ABO.

3.1.6 Estudio de inhibición de la actividad hemaglutinante por acción de carbohidratos

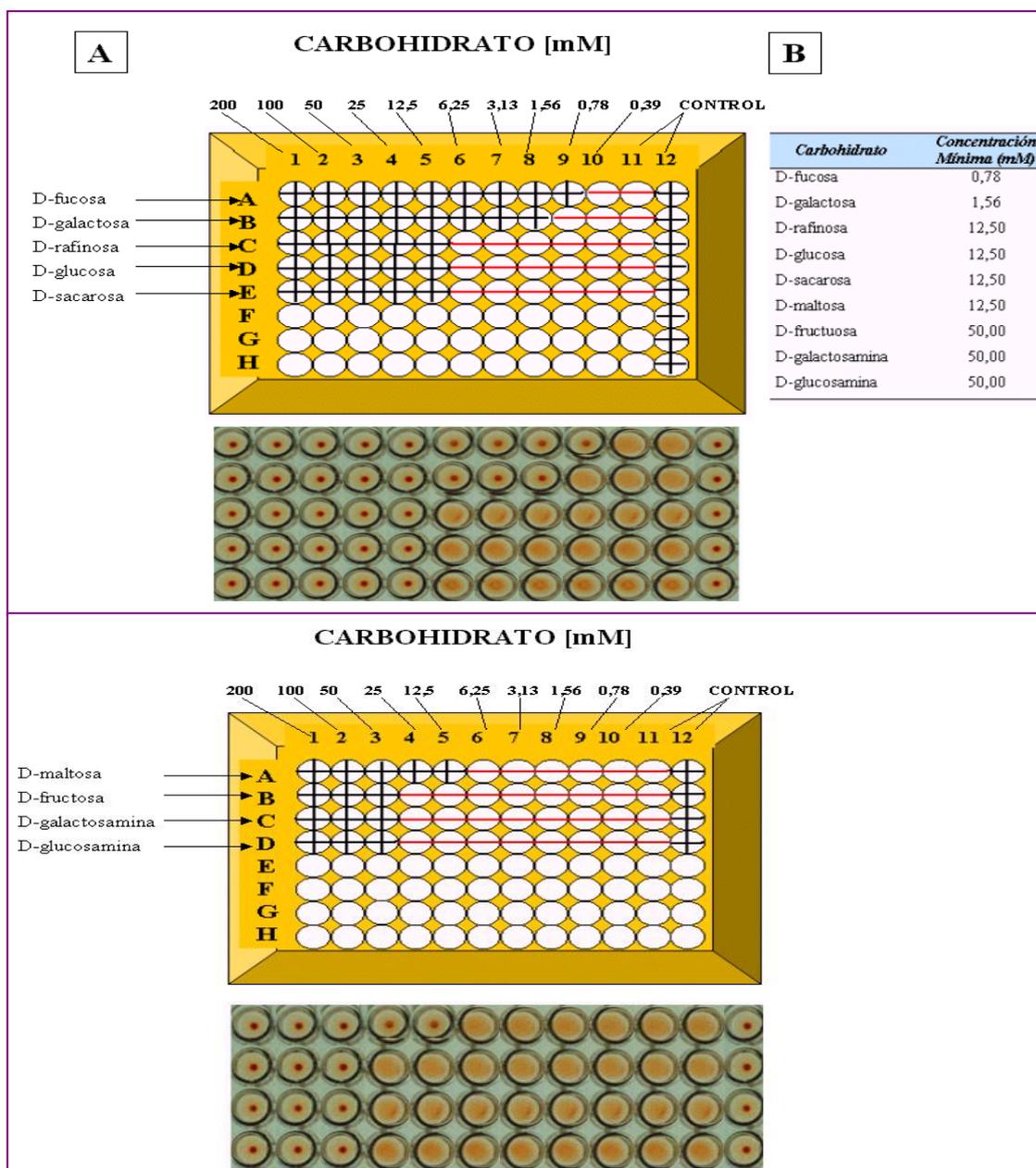
De acuerdo con la Figura 6A se realizaron diluciones seriadas de nueve carbohidratos, que fluctuaron desde 200 a 0,39 mM, con la finalidad de obtener la concentración mínima de carbohidrato capaz de inhibir la actividad hemaglutinante de la CqLEC inducida por 4 $\mu\text{g/ml}$ de CqLEC, sobre eritrocitos tripsinizados del grupo sanguíneo O Rh⁺.

Este procedimiento ha permitido determinar que la D-fucosa (0,78 mM) ejerce la inhibición más efectiva sobre la actividad hemaglutinante inducida por la CqLEC, lo cual concuerda con el hecho de que esta pentosa se encuentra en la superficie de la membrana eritrocitaria. Los demás carbohidratos empleados para este ensayo, que también inhibieron la actividad de la CqLEC, fueron los siguientes: D-galactosa (1,56 mM), D-rafinosa (12,50 mM), D-glucosa (12,50 mM), D-sacarosa (12,50 mM), D-maltosa (12,50 mM), D-fructuosa (50 mM), D-galactosamina (50,00 mM) y D-glucosamina (50,00 mM).

De este modo, la Figura 6B denota la gran plasticidad que tiene el CRD de la CqLEC respecto a los azúcares, pues muestra gran predilección (en primer lugar) por pentosas, luego por hexosas, di y trisacáridos, y finalmente por aminohexosas.

Figura 6

Prueba de inhibición de la actividad hemaglutinante de la CqLEC por carbohidratos



Nota. A) Representación esquemática y fotografía del ensayo de inhibición por carbohidratos de la actividad hemaglutinante inducida por CqLEC (4 µg/ml) en eritrocitos tripsinizados del grupo sanguíneo O Rh⁺. La placa de microtitulación fue incubada a temperatura ambiente durante 2 horas. Donde, ⊕ significa que hay inhibición, mientras que θ indica que no hay actividad inhibitoria por carbohidrato. **B)** Cuadro que muestra la concentración mínima de carbohidrato (mM) que inhibe la actividad hemaglutinante inducida por CqLEC frente a eritrocitos del grupo sanguíneo O Rh⁺.

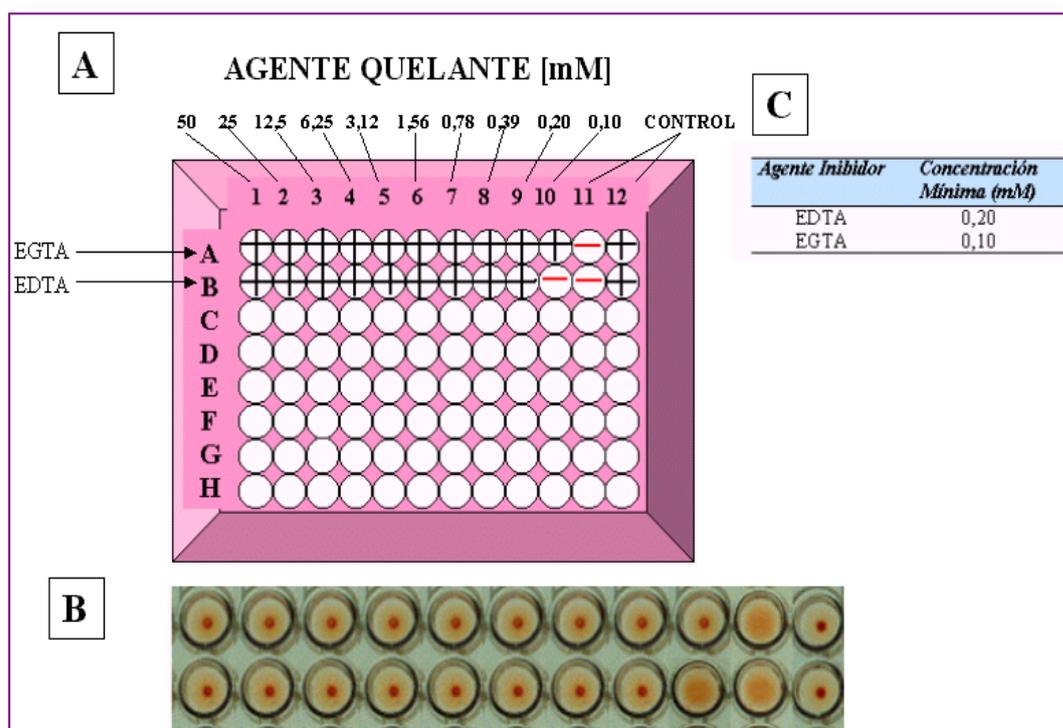
3.1.7 Estudio de inhibición de la actividad hemaglutinante por agentes quelantes

Como se observa en la Figura 7A se realizaron diluciones seriadas de dos agentes quelantes que fluctuaron desde 50 hasta 0,10 mM con la finalidad de obtener la concentración mínima de agente quelante capaz de inhibir la actividad hemaglutinante inducida por 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CqLEC sobre eritrocitos tripsinizados del grupo sanguíneo O Rh⁺.

De este modo, en la Figura 7B y 7C se puede observar que el EGTA (0,10 mM) inhibe mucho mejor la actividad hemaglutinante de la CqLEC a comparación del EDTA (0,20 mM), lo cual indica que esta lectina requiere la presencia de iones divalentes tales como calcio o manganeso para que el CRD pueda ligarse a algún carbohidrato.

Figura 7

Prueba de inhibición de la actividad hemaglutinante de la CqLEC por agentes quelantes



Nota. **A)** Representación esquemática del ensayo de inhibición, por agentes quelantes (EGTA y EDTA), de la actividad hemaglutinante inducida por CqLEC (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en eritrocitos tripsinizados del grupo sanguíneo O Rh⁺, la cual se llevó a cabo sobre una placa de microtitulación que fue incubada a temperatura ambiente durante 2 horas. Donde, \oplus significa que hay inhibición de la actividad hemaglutinante, mientras que \ominus indica que no hay actividad inhibitoria sobre la hemaglutinación. **B)** Fotografía del ensayo de inhibición de la hemaglutinación

por EGTA y EDTA sobre eritrocitos tripsinizados del grupo sanguíneo O Rh⁺, que muestra la formación de unos botones rojizos si la inhibición es positiva; mientras que, la formación de una película homogénea de eritrocitos indica que la inhibición es negativa. **C)** Cuadro que muestra la concentración mínima inhibitoria de cada agente quelante (mM) frente a la actividad hemaglutinante inducida por CqLEC, cuando se usa eritrocitos del grupo sanguíneo O Rh⁺.

3.1.8 Estudio de la actividad bactoaglutinante

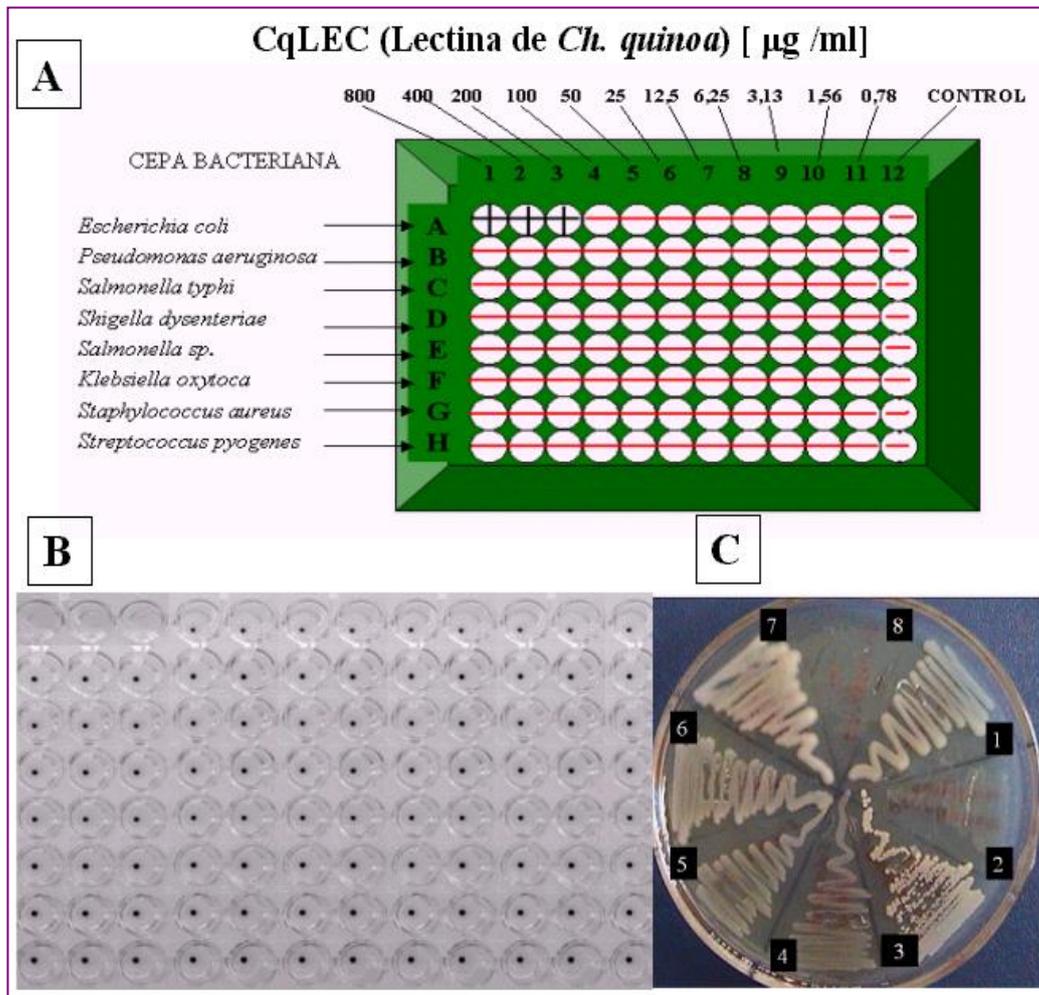
La Figura 8A presenta las diluciones seriadas de CqLEC que fluctuaron desde 800 hasta 0,78 µg/ml para obtener la concentración mínima bactoaglutinante (CMB), definida como la más pequeña cantidad de lectina capaz de aglutinar $1,5 \times 10^8$ UFC/ml de bacterias.

De las 8 bacterias patógenas que se estudiaron, sólo *Escherichia coli* fue capaz de ser ligada por la CqLEC a una CMB de 200 µg/ml. En cambio, otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella sp.* y *Klebsiella oxytoca* no fueron aglutinadas. Tampoco bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* fueron aglutinadas (Figura 8B).

Todas las bacterias analizadas fueron aisladas sobre agar tripticasa soya (TSA) y mantenidas a 4 °C hasta su empleo (Figura 8C).

Figura 8

Prueba de bactoaglutinación



Nota. A) Representación esquemática del ensayo de bactoaglutinación llevada a cabo en una placa de microtitulación con ocho bacterias patógenas, las cuales fueron coloreadas con violeta de genciana al 0,005 %, mostrándose la interacción de diferentes concentraciones de CqLEC ($\mu\text{g/ml}$). Donde, \oplus significa que hay bactoaglutinación, mientras que \ominus indica que no hay actividad bactoaglutinante.

B) Representación esquemática del ensayo de bactoaglutinación llevada a cabo en una placa de microtitulación con ocho bacterias patógenas, las cuales fueron coloreadas con violeta de genciana al 0,005 %, mostrándose la interacción de diferentes concentraciones de CqLEC ($\mu\text{g/ml}$). Donde, \oplus significa que hay bactoaglutinación, mientras que \ominus indica que no hay actividad bactoaglutinante.

C) Placa Petri con TSA incubada a 37 °C por 24 h, sobre la cual se desarrollaron 8 bacterias patógenas. Estas son: 1, *E. coli*; 2, *P. aeruginosa*; 3, *S. aureus*; 4, *S. typhi*; 5, *S. dysenteriae*; 6, *Salmonella sp.*; 7, *K. oxytoca*; y 8. *S. pyogenes*.

3.1.9 Estudio de la actividad insecticida

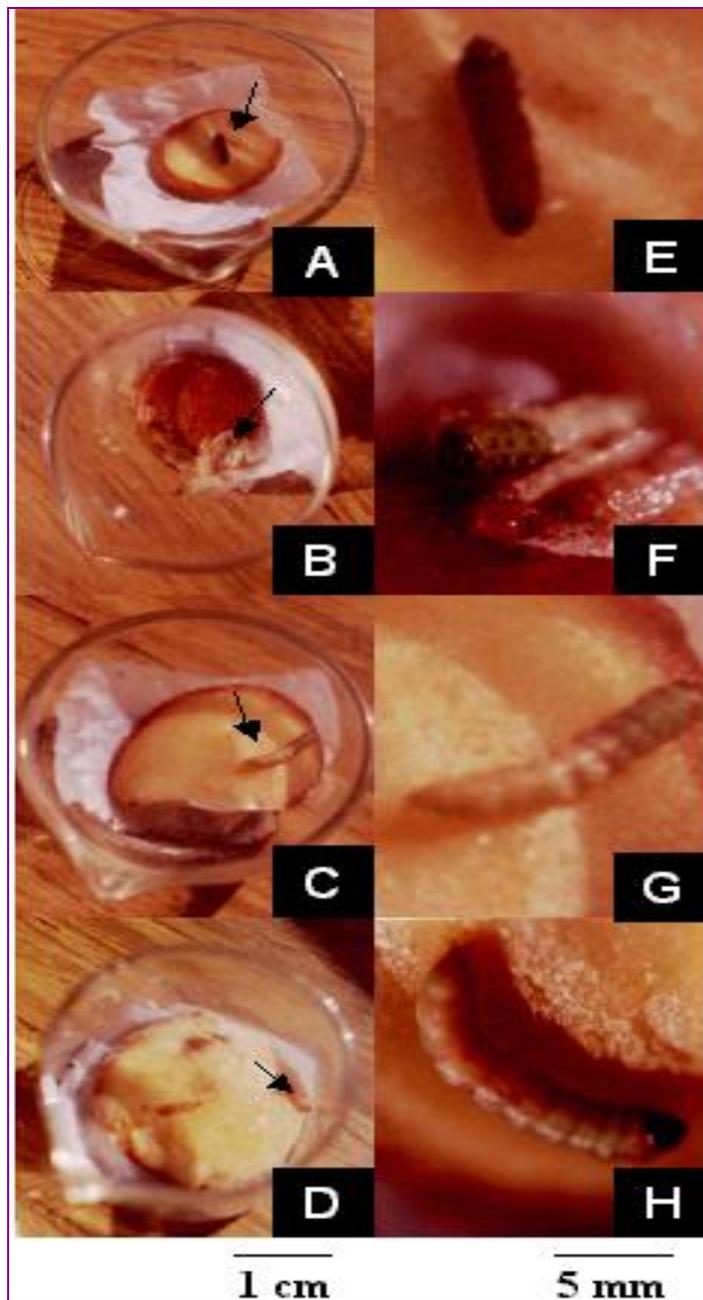
Para este ensayo se emplearon larvas de *Symmetrischnema plaesiosema* de segundo estadio, que luego de ser aclimatadas por 1 día fueron sometidas a 1000, 500, 250 y 125 ppm de CqLEC.

Como resultado se observó que las larvas murieron a las 16,56 h después de haber sido sometidas a un tratamiento de 1000 ppm de CqLEC, habiendo cambiado de un color verde ligeramente oscuro a pardo (Figura 9A y 9E). Asimismo, en la Figura 9B y 9F se observa que la larva de color verde claro sometida a un tratamiento de 500 ppm va perdiendo actividad en su desplazamiento muriendo finalmente a las 26,89 h; algo similar se observó con aquellas larvas que fueron sometidas a 250 y 125 ppm (Figuras 9C, 9G y 9D, 9H) donde las primeras empezaron a ser afectadas en la mitad inferior de su cuerpo que se tornó de un color manteca, mientras que la parte media superior mantenía un color aún verde, presentando además baja actividad de desplazamiento, muriendo a las 37 horas; en cambio, las segundas se vieron menos afectadas ya que hicieron varias galerías en la rodaja de papa antes de morir a las 52,33 horas.

El efecto obtenido por cada uno de los tratamientos de CqLEC sobre las larvas de papa indica, a través del ANOVA, que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos a los cuales murieron las larvas de *Symmetrischnema plaesiosema*. Además, el coeficiente de variabilidad (CV = 5,56) muestra haber homogeneidad entre y dentro de cada una de las unidades experimentales. La prueba de especificidad de Tukey, por su parte nos señala que el tratamiento de CqLEC a 1000 ppm ($P < 0,05$) fue el que mostró mejor efecto insecticida (Anexo 6).

Figura 9

Prueba de actividad insecticida de la CqLEC sobre larvas de *Symmetrischnema plaesiosema*



Nota. **A, B, C y D** Larvas (flecha) tratadas con CqLEC a 1000, 500, 250 y 125 ppm respectivamente, las cuales se hallaban desarrollando sobre rodajas de papa de 4 x 0,5 cm a temperatura ambiente.

E, F, G y H Larvas correspondientes a los tratamientos antes mencionados en el mismo orden, en la cual se observa que el primero de los tratamientos ejerce un efecto insecticida más eficaz ($P < 0,05$) a comparación de los demás tratamientos, lo cual se denota por una coloración pardo oscuro que adquiere esta larva.

La CqLEC fue sometida a hidrólisis ácida (HCl 6N) y a derivatización por PITC para obtener la composición completa de aminoácidos (Tabla 1). Los datos indican que la CqLEC contiene 70,54 % de aminoácidos hidrofílicos (carga neutra 18,75 %; carga negativa 40,18 %; carga positiva 11,61 %) y 29,46 % de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica. Ésto demuestra que la CqLEC es una proteína de naturaleza hidrofílica y ácida condicionada por Glu y Asp. Por otro lado, esta lectina se halla compuesta de 112 aminoácidos y tiene una masa molecular de ~12,86 kDa. Es importante señalar que las condiciones extremas de acidez bajo las cuales se realizó el análisis de aminoácidos impidieron cuantificar el Trp, mientras que la Gln y Asn se presentaron como Glu y Asp, respectivamente.

En general, la representatividad de cada aminoácido dentro de la CqLEC fue la siguiente: Glu (37 residuos), Gly (9 residuos), Asp (8 residuos), Ser (8 residuos), Arg (8 residuos), Ile (7 residuos), Cys (6 residuos), Leu (5 residuos), Val (5 residuos), Thr (4 residuos), Lys (4 residuos), Tyr (3 residuos), Ala (3 residuos), Pro (2 residuos), His (1 residuo), Met (1 residuo) y Phe (1 residuo). Es interesante mencionar que la presencia de 6 residuos de Cys en la CqLEC probablemente estén implicados en la estabilidad estructural de la lectina, frente a cambios en el pH y la temperatura, ya que darían lugar a 3 puentes disulfuro intracadena.

Tabla 1

Composición de aminoácidos de la CqLEC aislada a partir de semillas de *Ch. quinoa*

| Nº | naturaleza | tipo | sigla | m aa | cantidad | PM aa | % |
|----|-------------|------------|-------|--------|----------|----------|--------|
| 1 | Ácido | Asp | D | 115,10 | 8 | 920,80 | 7,14 |
| 2 | Acido | Glu | E | 129,10 | 37 | 4776,70 | 33,04 |
| 3 | Polar s/c | Ser | S | 87,10 | 8 | 696,80 | 7,14 |
| 4 | Hidrofóbico | Gly | G | 57,00 | 9 | 513,00 | 8,04 |
| 5 | Básico | His | H | 137,10 | 1 | 137,10 | 0,89 |
| 6 | Básico | Arg | R | 156,20 | 8 | 1249,60 | 7,14 |
| 7 | Polar s/c | Thr | T | 101,10 | 4 | 404,40 | 3,57 |
| 8 | Hidrofóbico | Ala | A | 71,10 | 3 | 213,30 | 2,68 |
| 9 | Hidrofóbico | Pro | P | 97,10 | 2 | 194,20 | 1,79 |
| 10 | Polar s/c | Tyr | Y | 163,20 | 3 | 489,60 | 2,68 |
| 11 | Hidrofóbico | Val | V | 99,10 | 5 | 495,50 | 4,46 |
| 12 | Hidrofóbico | Met | M | 131,20 | 1 | 131,20 | 0,89 |
| 13 | Polar s/c | Cys | C | 103,10 | 6 | 618,60 | 5,36 |
| 14 | Hidrofóbico | Ile | I | 113,20 | 7 | 792,40 | 6,25 |
| 15 | Hidrofóbico | Leu | L | 113,20 | 5 | 566,00 | 4,46 |
| 16 | Hidrofóbico | Phe | F | 147,20 | 1 | 147,20 | 0,89 |
| 17 | Básico | Lys | K | 128,20 | 4 | 512,80 | 3,57 |
| | | | | | 112 | 12859,20 | 100,00 |

Nota. **maa**: mol de aminoácido **PM aa**: peso molecular de aminoácido por proteína **%**: mol de aminoácido por 100 moles de aminoácidos totales. **s/c**: sin carga

3.1.10 Determinación de la secuencia aminoácidica N-terminal y estudio de homología secuencial

La Figura 10 muestra la secuencia de los 23 aminoácidos correspondientes a la región N-terminal de la CqLEC (SDSLRSFTFNNFPAAXNSEDLIF...), la cual fue obtenida empleando el secuenciador de aminoácidos 477 (Applied Biosystems) que emplea la técnica de degradación de Edman. Asimismo, se puede observar el grado de homología secuencial que existe entre la CqLEC y un grupo de 10 proteínas generados por la SWISS-PROT.

El análisis de homología secuencial demostró que la CqLEC tiene gran similitud (82,61 %) con el precursor de la aglutinina I (ClA1) extraída de la corteza de

Cladrastis kentukea (Fabaceae, Papilionoideae), compuesta de 293 aminoácidos, la cual tiene afinidad por manosa/glucosa.

Otras de las proteínas que presentaron similitud con la CqLEC fueron las siguientes: el precursor de la lectina con 293 aminoácidos, extraída de la corteza del pagoda japonés *Sophora japonica* (Fabaceae, Papilionoideae) (Homología: 65,22 %); la cadena polipeptídica a-1 de la lectina B-SJA-II específica de manosa, con una secuencia N-terminal de 24 aminoácidos, extraída de la corteza del pagoda japonés *Sophora japonica* (Homología: 60,87 %); la lectina de 284 aminoácidos extraída de la raíz de *Sophora flavescens* (Homología: 60,87 %); el precursor de la leucoaglutinina con 287 aminoácidos, extraída de *Maackia amurensis* (Fabaceae, Papilionoideae) (Homología: 60,87 %); el precursor de la lectina con 282 aminoácidos, extraída de la corteza de *Maackia amurensis* (Homología: 60,87 %); la cadena polipeptídica a-2 de la lectina B-SJA-II específica de manosa, con una secuencia N-terminal de 33 aminoácidos, extraída de la corteza del pagoda japonés *Sophora japonica* (Fabaceae, Papilionoideae) (Homología: 56,52 %); la proteína hipotética de 1221 aminoácidos, obtenida a partir de la secuencia genómica del hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Ascomycota, Sordariaceae) (Homología: 52,17 %); la lectina de 266 aminoácidos, extraída de la corteza del pagoda japonés *Sophora japónica* (Fabaceae, Papilionoideae) (Homología: 43,48 %); y el precursor de la aglutinina II (CLA II) con 290 aminoácidos, extraída de la corteza de *Cladrastis kentukea* (Fabaceae, Papilionoideae) (Homología: 43,48 %).

Figura 10

Análisis de homología secuencial de la región-N terminal de la lectina CqLEC extraída de semillas de Ch quinoa cv. Salcedo-INIA con otras proteínas que presentan actividad aglutinante.

| registro | N | 1 | * | 5 | * | * | 10 | 15 | 20 | C | % | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|---|---|---|---|---|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|-------|--------|
| CqLEC | 1 | S | D | S | L | R | S | F | T | F | N | N | F | P | A | A | X | N | S | E | D | L | I | F | ... | 23 | 100,00 |
| 4033445 | 36 | S | D | S | L | - | S | F | T | F | N | N | F | P | P | - | - | N | S | E | D | L | I | F | ... | 55 | 82,61 |
| 1755068 | 36 | S | D | S | L | - | S | F | T | Y | E | N | F | P | - | - | N | P | E | D | L | I | - | ... | 54 | 65,22 | |
| 100092 | 1 | S | D | S | L | - | S | F | T | Y | E | N | F | Q | - | - | N | P | E | D | L | I | - | ... | 19 | 60,87 | |
| 9837276 | 32 | S | D | S | L | - | S | F | T | F | S | D | F | D | - | - | N | G | E | D | L | L | F | ... | 50 | 60,87 | |
| 7442137 | 30 | S | D | E | L | - | S | F | T | I | N | N | F | P | - | - | N | E | A | D | L | L | F | ... | 49 | 60,87 | |
| 1755078 | 25 | S | D | E | L | - | S | F | T | I | N | N | F | P | - | - | N | E | A | D | L | L | F | ... | 44 | 60,87 | |
| 100093 | 2 | - | D | S | L | - | S | F | T | Y | D | N | F | Q | - | - | N | P | E | D | L | I | - | ... | 19 | 56,52 | |
| 32411247 | 161 | S | E | S | L | H | S | F | S | F | - | - | - | - | A | H | Q | S | E | D | L | I | - | ... | 177 | 52,17 | |
| 1755066 | 17 | - | D | S | L | - | S | F | T | F | N | N | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ... | 27 | 43,48 |
| 4033446 | 36 | S | D | S | L | - | S | F | T | F | D | N | F | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ... | 46 | 43,48 |

Nota. N, es el extremo N-terminal; C, el extremo C-terminal; %, porcentaje de homología secuencial con respecto a la CqLEC; y *, aminoácidos invariables. Los aminoácidos en el recuadro azul representan regiones de consenso. Entre las 10 proteínas comparadas están: 4033445, precursor de la aglutinina I extraída de la corteza de *Cladrastis kentukea* (Van Damme et al., 1995); 1755068, precursor de la lectina extraída de la corteza de *Sophora japonica* (Van Damme et al., 1997a); 100092, cadena a-1 de la lectina B-SJA-II específica de manosa extraída de la corteza de *Sophora japonica* (Ueno et al., 1991); 9837276, lectina extraída de la raíz de *Sophora flavescens* (Yan et al., 2000); 7442137, precursor de la leucoaglutinina extraída de *Maackia amurensis* (Yamamoto et al., 1997); 1755078, precursor de la lectina extraída de la corteza de *Maackia amurensis* (Van Damme et al., 1997b); 100093, cadena a-2 de la lectina B-SJA-II específica de manosa extraída de la corteza de *Sophora japonica* (Ueno et al., 1991); 32411247, proteína obtenida de la secuencia genómica del hongo filamentoso *Neurospora crassa* (Birren 2003); 1755066, lectina extraída de la corteza de *Sophora japonica* (Van Damme et al., 1997); y 4033446, precursor de la aglutinina II (CLAII) extraída de la corteza de *Cladrastis kentukea* (Van Damme et al., 1995).

3.2 Discusión

3.2.1 Aislamiento y purificación de CqLEC

Son alrededor de 500 las lectinas vegetales aisladas y caracterizadas (parcialmente). 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 secuencial en siete familias de proteínas relacionadas estructural y evolutivamente: lectinas de leguminosas, lectinas ligadoras de quitina con dominios de heveina, lectinas ligadoras de manosa de monocotiledóneas, proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II, las amarantinas, las lectinas relacionadas con jacalina y las lectinas de floema de las Cucurbitaceae (Peumans y Van Damme, 2001).

De este modo, en el presente estudio se ha encontrado que la CqLEC, purificada de semillas de *Chenopodium quinoa* cv. Salcedo-INIA, corresponde a una proteína ácida de 112 aminoácidos con un peso molecular de ~12,86 kDa, capaz de aglutinar preferencialmente eritrocitos del grupo O Rh⁺ (1,95 µg/ml); y de ser inhibida por fucosa (0,78 mM) y EGTA (0,10 mM). Es decir, que la CqLEC reportada aquí es una proteína con un peso molecular más bajo que la lectina de quinua estudiada por Portugal et al. (2002) quienes señalan que ésta tiene una masa molecular de 29 kDa. Asimismo, el EGTA (con gran afinidad específica por el Ca²⁺) fue capaz de inhibir la actividad hemaglutinante de la CqLEC mucho mejor que el EDTA (con afinidad por el Mg²⁺, Mn²⁺ Zn²⁺ y Ca²⁺), lo cual indica que se trata de una lectina dependiente principalmente de calcio (tipo C), estando en segundo lugar otros cationes divalentes. Se puede indicar además que la CqLEC es una lectina extracelular, lo cual es apoyado indirectamente por estudios de Varriano y De Francisco (1984), Koziol (1992) y Konishi et al. (2004) quienes señalan que el calcio (149 mg/100 g) en semillas maduras de *Ch quinoa* cv. Real Bolivia se encuentra principalmente en el pericarpio y cubierta de la semilla, lo mismo que en el límite entre el perisperma y el embrión. Entre algunas de las lectinas con peso molecular parecido a la CqLEC se encuentran: la lectina aislada de bulbos de *Zephyranthes canadia* con un peso molecular de 14 kDa y capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo (370 µg/ml), la cual es inhibida por manosa (Wu et al., 2001); la lectina LRA aislada de bulbos de *Lycoris radiata* con un peso molecular de 12,5

kDa, también capaz de aglutinar eritrocitos de conejo (60 µg/ml), y de ser inhibida por manosa (Bao et al., 2001); la lectina ácida de 21 kDa del alga *Ulva fasciata* capaz de aglutinar eritrocitos del grupo sanguíneo O, siendo inhibida por L-fucosa y EDTA (Pereira et al., 2001); y la lectina de 26 kDa extraída de semillas de *Vatairea macrocarpa* la cual aglutina eritrocitos humanos y de conejo, siendo inhibida por galactosa (Ramos et al., 2001). No obstante, existen lectinas de peso molecular más elevado, como son: la lectina de 40 kDa aislada de semillas de *Talisia esculenta* (Freire et al., 2001b); la lectina de 78 kDa aislada de 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 (123,5 kDa) de naturaleza ácida extraída de semillas de *Luetzelburgia auriculata* que posee la capacidad de aglutinar eritrocitos de conejo siendo inhibida por ácido N-acetil-D-neuramínico (390 mM) (Oliveira et al., 2001); y la lectina ligadora de manosa de 58 kDa aislada de semillas de *Parkia discolor* (Leite et al., 2001).

3.2.2 Actividad biológica de la CqLEC

Una de las aplicaciones más importantes de las lectinas en microbiología es la agregación directa de microorganismos en suspensión, ya que cada carbohidrato expuesto en la superficie bacteriana es un sitio potencial para su reconocimiento. Una reacción positiva puede ser empleada como una prueba presuntiva de la presencia del organismo. El prerrequisito básico para la interacción entre la mayoría de lectinas y los glicoconjugados de las superficies microbianas es que los receptores contengan azúcares no reductores (Etzler, 1986).

Los resultados obtenidos señalan que la CqLEC tiene afinidad específica por *Escherichia coli* uropatógena, un bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, cuyo hábitat natural es el tracto gastrointestinal; lo cual probablemente este mediado por la presencia de azúcares como la glucosa, la galactosa y la N-acetilglucosamina que forman parte de la estructura glicosídica de los lipopolisacáridos de la pared celular (Blanco et al., 1996). De igual modo, el antígeno somático O compuesto por las hexosas antes mencionadas y la presencia de iones calcio constituirían el blanco perfecto para que sean reconocidas por el CRD de la CqLEC. Es por esto, que el empleo de lectinas como herramientas de diagnóstico microbiológico han venido surgiendo con bastante fuerza como es el

caso del estudio llevado a cabo, por ejemplo, con 40 muestras de *Neisseria gonorrhoeae* (19 muestras resistentes a penicilina, aisladas de 8 pacientes heterosexuales y 11 pacientes homosexuales; y 21 muestras susceptibles a dicho antibiótico aisladas de 15 pacientes heterosexuales y 6 homosexuales), en las que determinaron su reactividad frente a las siguientes 14 lectinas: concanavalina A, aglutinina de *Lens culinaris*, aglutinina de *Trichosanthes kinlowii*, aglutinina I de *Griffonia simplicifolia*, aglutinina de *Arachis hypogaeae*, aglutinina de *Glycine max*, aglutinina de *Dolichos biflorus*, aglutinina II de *Griffonia simplicifolia*, aglutinina de *Solanum tuberosum*, aglutinina de *Triticum vulgare*, aglutinina de *Limax flavus*, aglutinina de *Phaseolus vulgaris*, aglutinina I de *Ulex europaeus*, y aglutinina de *Lotus tetragonolobus*. Asimismo, todas estas muestras fueron serotipadas con anticuerpos monoclonales específicos para la proteína I de la membrana gonocócica externa e incluso fueron auxotipados, por otro lado, se determinó el contenido plasmídico. Como resultado se obtuvo dos patrones de aglutinación, uno de ellos correspondiente al serogrupo IB (serovares IB-1, IB-2, y IB-4), mientras que 12 de los 21 controles fueron del serogrupo IA ($P < 0,05$). De igual forma, las muestras obtenidas de diferentes partes anatómicas (cervical y rectal) en cada paciente estuvieron relacionadas con los patrones de lectina y serovares, pero no con los auxotipos. Cabe destacar la gran afinidad de la WGA por *N. gonorrhoeae* (Schalla et al., 1985).

Otra investigación relacionada con el presente trabajo fue llevada a cabo con 35 muestras de *Helicobacter pylori* y la cepa NCTC 11637, las cuales fueron sometidas a ocho lectinas vegetales correspondientes a: *Anguilla anguilla* (AAA), *Lotus tetragonolobus* (Lotus A), y *Ulex europaeus* I (UEA I), específicas para α -L-fucosa; *Solanum tuberosum* (STA) y *Triticum vulgare* (WGA), específica para β -N-acetilglucosamina; *Glycine max* (SBA), específica para β -N-acetilgalactosamina; *Erythrina cristagalli* (ECA), específica para β -galactosa y β -N-acetilgalactosamina; y *Lens culinaris* (LCA), específica para α -manosa y α -glucosa. Tres de estas lectinas (SBA, STA, y LCA) no fueron útiles para la discriminación de cepas, pero en cambio cinco de ellas (AAA, ECA, Lotus A, UEA I, y WGA) lograron promover ocho patrones de reacción lectínica (Hynes et al., 1999).

En lo que respecta a la actividad insecticida de la CqLEC, ésta una vez consumida probablemente atraviesa sin problema todo el intestino anterior al ligarse

temporalmente con los azúcares de la dieta del insecto, es decir con monómeros glucosídicos del almidón. Puesto que esta lectina tiene afinidad por fucosa, galactosa y muy escasamente por D-glucosamina, significa que no se liga directamente a la membrana peritrófica, que consta de una mucoproteína en la cual las fibrillas de quitina, constituida por N-acetilglucosamina, están ordenadas irregularmente o en grupos hexagonales u octogonales; quedando dos posibilidades, siendo una de ellas que se ligue a enzimas glicosiladas como es el caso de los inhibidores de alfa amilasas, mientras que la otra y más probable es que interaccionen con los azúcares de las glicoproteínas de las células columnares que revisten el epitelio intestinal, las cuales se hallan activamente implicadas en la secreción de enzimas (carbohidrasas, lipasas, proteasas) y la absorción de los productos de la digestión (Peumans y Van Damme, 1995; Zhu et al., 1998).

Sin embargo, se ha encontrado lectinas con acción más potente que la que se reporta aquí, perteneciente a la gran familia de las fitohemaglutininas y las RIPs (proteínas inactivadoras de ribosomas), siendo algunas de ellas capaces de inducir apoptosis a través de la activación de endonucleasas que provocarían la fragmentación del ADN y eventualmente la muerte celular (Peumans et al., 2001). Así, la presencia de un polipéptido llamado arcelina, en la familia de las fitohemaglutininas encontrada por Osborn y colaboradores en variedades mexicanas de frijol, otorgaba resistencia frente a dos gorgojos (*Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*) que son predadores de cultivos domésticos (Osborn et al., 1988).

Algo similar a lo anterior es probable que acontezca con la CqLEC, pero esto no significa que cultivos domésticos carezcan de lectinas con actividad defensiva i/o tóxica, sobre todo en aquellas provenientes de semillas, ya que estas estructuras constituyen el patrimonio genético de toda planta. Por otro lado, Murdock et al. (1990) empleando un sistema de semilla artificial, demostraron de que un 1 % (p/p) de WGA (aglutinina de germen trigo) retrasó el desarrollo larval de 32 días a 55 días, y que las tres isolectinas de WGA tienen efectos similares (Huesing et al., 1991a). Resultados parecidos han sido obtenidos ahora con la lectina de arroz y UDA (aglutinina de *Urtica dioica*) (Huesing et al., 1991b). Sin embargo, las lectinas purificadas de chamico y tomate tienen un efecto significativamente menor sobre el desarrollo de las larvas del gorgojo del caupí. Recientemente, también se ha

demostrado a través de experimentos *in vitro* que la WGA tiene un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de dos importantes plagas del maíz, el barrenador de maíz (*Ostrinia nubilalis*) y el gusano radicular de maíz (*Diabrotica undecimpunctata*) (Czapla y Lang, 1990). Estos investigadores han demostrado de que la incorporación de 0,059 % de WGA (p/p) dentro de la dieta artificial de las larvas del barrenador de maíz europeo produce 50% de mortalidad. Aunque el modo de acción de estas lectinas ligadoras de quitina no es muy conocido, se especula que sus efectos deletéreos sobre el desarrollo del insecto son mediados por el ligamiento a quitina de la membrana peritrófica que reviste el intestino medio de los insectos. Este ligamiento podría interferir con la absorción de nutrientes (Chrispeels y Raikhel, 1991). Ésto demuestra que la CqLEC es una lectina con regular capacidad insecticida ya que es necesaria la presencia de 1000 ppm (1000 µg/ml) para ejercer su efecto insecticida, a diferencia de otras que tan solo requieren de 100 ug/ml (Peumans et al., 2001).

Experimentos más recientes indican que las lectinas provenientes de tubérculo de papa (*Solanum tuberosum*), semillas de maní (*Arachis hypogaea*), y semillas de naranja osage (*Maclura pomifera*) tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de la larva del gorgojo del caupí. De igual modo, la lectina de la hierba carmín (*Phytolacca americana*) mató a la larva del gusano radicular del maíz. Resultados muy prometedores, también han sido obtenidos con unas cuantas lectinas ligadoras de manosa obtenidas a partir de plantas monocotiledóneas. Los bioensayos de alimentación con lectinas purificadas a partir de la campanilla de invierno (*Galanthus nivalis*) y ajo (*Allium sativum*) indican que ellas son moderadamente activas en contra de insectos masticadores, tales como el gorgojo del caupí y el gusano cornudo del tabaco (*Spodoptera litoralis*). Bastante importante, sin embargo, resultó el hecho de que la lectina de la campanilla de invierno mostrara una alta toxicidad frente a insectos chupadores no solo en las pruebas con dietas artificiales, sino también en experimentos con plantas transgénicas (Chrispeels y Raikhel, 1991).

3.2.3 Caracterización bioquímica de la CqLEC

La CqLEC comprende 112 aminoácidos y es por naturaleza una proteína ácida, pero en su composición encontramos otros aminoácidos que de una u otra forma participan en el modelamiento estructural y funcional de esta lectina. Entre las

funciones generales que cada uno de los 20 aminoácidos cumplen en una proteína y las proporciones específicas que se han encontrado para la CqLEC tenemos que señalar lo siguiente: la glicina (8 %) por tener hidrógeno como resto en el C α , es un aminoácido que incrementa la flexibilidad de la cadena proteica y permite el plegamiento de esta sobre sí misma. Por esta razón es un aminoácido muy conservado en el proceso evolutivo. Por el contrario, la prolina (1,8 %), α -iminoácido en el que el grupo R se encuentra enlazado tanto al C α como al grupo amino, es el aminoácido que más limitaciones estereoquímicas presenta, debido a que posee un único enlace con posibilidad de giro (ψ) y no es capaz de formar puentes de hidrógeno con el grupo -NH-. Por este motivo, se encuentra casi siempre en zonas de *acodamientos* β y, por tanto, en la superficie de la proteína. Los aminoácidos con ramificación en el C β (valina [4,5 %], leucina [4,5 %], isoleucina [6,3 %]) contribuyen al plegamiento de la proteína al disminuir los grados de libertad de la cadena por impedimentos estéricos. La presencia en los aminoácidos fenilalanina [0,9 %] y tirosina [2,7 %] de un grupo metileno entre el C α y el núcleo aromático impide los efectos estéricos de este grupo sobre el C α , que forma parte del eje central de la proteína. Los aminoácidos serina [7,1 %], treonina [3,6 %] y tirosina [2,7 %] son importantes desde el punto de vista estructural por su capacidad para formar puentes de hidrógeno. La cisteína (5,4 %) es la única fuerza covalente implicada en el mantenimiento de la estructura proteica (Chothia, 1984; Blake y Jonson, 1984).

Los aminoácidos con carga (ácido aspártico [7,1 %], ácido glutámico [33,0 %], lisina [3,6 %] y arginina [7,1 %]) se suelen encontrar en la superficie de la macromolécula contribuyendo a la solubilidad de la misma en el medio acuoso. Junto a la histidina (0,9 %), dichos aminoácidos son los más comunes en los dominios de las proteínas. La lisina y arginina sirven, además, como punto de reconocimiento en la proteína a distintas proteasas encargadas de su modificación (Rossmann y Argos, 1981).

Concerniente a la determinación de la secuencia aminoacídica de la región N-terminal y el estudio de homología secuencial de la CqLEC, purificada de semillas de *Ch. quinoa* cv. Salcedo-INIA, se tiene que ésta se encuentra emparentada con la familia de lectinas de leguminosa calcio dependientes, las cuales son específicas de manosa/glucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, fucosa o N-acetilglucosamina

(Adar y Sharon, 1996). Por esta razón, es que ella tal vez podría participar de algunas propiedades correspondientes a lectinas representativas de esta familia como es la PHA, una hemaglutinina y mitógeno abundante que ha sido completamente caracterizada (Goldstein y Hayes, 1978). Esta lectina tetramérica está compuesta de cinco isoformas de los polipéptidos PHA-E y PHA-L en distintas combinaciones. Los tetrámeros de PHA-E ($M_r = 34\ 000$) aglutinan eritrocitos, mientras que los tetrámeros de PHA-L ($M_r = 32\ 000$) aglutinan leucocitos y tienen actividad mitogénica. Los tetrámeros combinados pueden ligar ambos tipos de células sanguíneas. Tanto la PHA-E como la PHA-L reconocen residuos de galactosa al igual que la CqLEC. Los polipéptidos PHA-E y PHA-L son codificados por dos genes asociados en tándem, la *dle1* y la *dlec2*, respectivamente (Hoffman y Donaldson, 1985). Estos genes, los cuales son 90 % homólogos a nivel nucleotídico, codifican proteínas que tienen 82% de similitud en sus secuencias aminoacídicas. La biosíntesis, modificaciones post-traduccionales, y transporte de PHA hacia la vacuola, hace presumir que la CqLEC esté siguiendo la misma ruta (Chrispeels y Raikhel, 1991).

3.3 Conclusiones

- Por extracción salina, cromatografía en Sephadex G100 y Sephadex G75 se logró aislar CqLEC (5,53 mg/ml de proteína) con actividad hemaglutinante.
- La obtención de la CqLEC por HPLC de fase reversa se logró a los 32 minutos con 54 % de tampón B. Asimismo, el SDS-PAGE mostró que la lectina purificada es homogénea y tiene una sola cadena polipeptídica de 12,82 kDa.
- La CqLEC aglutinó principalmente eritrocitos del grupo sanguíneo O Rh⁺ con una CMH de 1,95 µg/ml, la cual fue inhibida por fucosa (0,78 mM) y EGTA (0,1 mM), lo que indica que se trata de una lectina ligadora de fucosa dependiente de calcio. Además, muestra una bactoaglutinación específica frente a *E. coli* (CMB igual a 200 µg/ml) y actividad insecticida frente a larvas de *Symmetrischema plaesiosema* (1000 ppm).
- El análisis de composición de aminoácidos reveló que la CqLEC es una lectina con una masa molecular de 12,86 kDa de naturaleza ácida (70,54 % de residuos hidrofílicos y 29,46 % de residuos hidrofóbicos), predominando Glu (33 %). El

estudio de homología secuencial indica que se halla emparentada con lectinas de la familia de las leguminosas, mostrando 82,61 % de similitud secuencial con la aglutinina I extraída de la corteza de *Cladrastis kentukea*. Los aminoácidos altamente conservados en su estructura son la leucina 4, la serina 6 y la fenilalanina 7.

REFERENCIAS

- Adar, R. & Sharon, N. (1996). Mutational studies of the amino acid residues in the combining site of Erythrina corallodendron lectin. *Eur J Biochem.* 239 (3): 668-674.
- Ali, N. (1991). Soluble β -galactoside binding lectins: physicochemical and functional properties. *Biochem. Edu.* 19: 2-6.
- Álvarez, D., De la Fuente, J., Villarubia, O., Menéndez, J. y Ortiz, E. (2003). Actividad biológica de *Ricinus communis* sobre mosca doméstica (*Musca domestica*). *Rev. Cubana Med. Trop.* 48 (3): 192-194.
- Ayala, C. (1977). Efecto de localidades en el contenido de proteínas en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Ing. Agro. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Técnica del Altiplano. Puno - Perú.
- Ayoub, A., Causse, H., Van Damme, E., Peumans W., Cambillau, C. & Rougé, P. (1994). Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Biochem Syst Ecol.* 22: 153-159.
- Bao, J., Wu, C., Zhang, J., Lu, H., Wang, K. & Long, H. (2001). The characterization and biological activity of *Lycoris radiata* agglutinin – a lectin F. 19th INTERLEC. Brazil.
- Barbieri, L., Battelli, M. & Stirpe, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochim Biophys Acta.* 1154 (3-4): 237-282.
- Barondes, S., Cooper, D., Gitt, M. & Leffler, H. (1994). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem.* 269 (33): 20807-20810.
- Bertero, H., King, R. & Hall, A. (1999). Photoperiod-sensitive development phases in quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Field Crops Res.* 60: 231-243.
- Bidlingmeyer, B., Cohen, S. & Tarvin, T. (1984). Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J.Chromat.* 33: 93-104.
- Bing, D., Weyand, J. & Stavitsky, A. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc Soc Exp Biol Med.* 124 (4): 1166-1170.
- Birren, B. (2003). Direct Submission. Submitted Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research, 320 Charles Street, Cambridge, MA 02142. USA.
- Blake, C. & Johnson, L. (1984). Protein structure. *TIBS.* 147-151.
- Blanco, Je., Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Mouriño, M., Juárez, A. & Jansen, W. (1996). O serogroups, biotypes and eae genes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 34: 3101-3107.

- Bohlool, B. & Schmidt, E. (1974). Lectins: A possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. *Science*. 185: 269-271.
- Broekaert, W. & Peumans, W. (1986). Lectin release from seeds of the *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. In TC Bog-Hansen, E Van Driessche, eds, *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Vol 5. Walter de Gruyter, Berlin, pp 57-65.
- Broekaert, W., Van Parijs, J., Leyns F., Joos H. & Peumans, W. (1989). A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*. 245: 1100-1102.
- Broekaert W., Marien W., Terras F., De Bolle M., Proost P., Van damme J., Dillen L., Claeys M., Rees S., Vanderleyden J. & Cammue B. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. *Biochemistry*. 31: 4308-4314.
- 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 (Tokyo)*. 44 (5): 685-696.
- Carvalho D., Marangoni S., Oliveira B. & Novello J. (1998). Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Biochem. Mol. Biol. Inter.* 44 (5): 933-938.
- Ceccatti, J. (2004). Resisting insects: shifting strategies in chemical control. *Endeavour*. 28 (1): 14-19.
- Chothia, C. (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 53: 537-572.
- Chrispeels, M. & Raikhel, N. (1991). Lectins, Lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell*. 3: 1-9.
- Collinge, D., Kragh, K., Mikkelsen, J., Nielsen K., Rasmussen, U. y Vad, K. (1993). Plant chitinases. *Plant J*. 3: 31-40.
- 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.
- Coulter, L. & Lorenz, K. (1990). Quinoa, composition nutritional value, food application. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*. 3: 203-207.
- Czapla, T. & Lang, B. (1990). Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) and Southern corn rootworm (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485.

- De Miranda Santos, I. & Pereira, M. (1984). Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic South American trypanosomes. *Am J Trop Med Hyg.* 33 (5): 839-844.
- Diaz, C., Melchers, L., Hooykaas, P., Lugtenberg, B. & Kijne, J. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature.* 338: 579-581.
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem.* 263(20): 9557-9560.
- Drickamer, K., Dordal, M. & Reynolds, L. (1986). Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. *J Biol Chem.* 261(15): 6878-6887.
- Edman, P. & Begg, G. (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1: 80-91.
- Etzler, M. (1986). Distribution and function of plant lectins. In the *Lectins*, I.E. Liener, N. Sharon, e I.J. Goldstein, eds (San Diego; Academic Press), pp. 371-435.
- Fountain, D., Foard, D., Replogle, W. & Yang, W. (1977). Lectin release by soybean seeds. *Science.* 197: 1185-1187.
- Freire, M., Machado, O., Smolka, M., Marangoni, S., Novello, J. & Macedo M. (2001a). Isolation and characterization of isolectins from *Talisia 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 *Talisia esculenta* seeds: isolation and cell migration inducing. 19th INTERLEC. Brazil.
- Gabius, H. (1994). Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. *Int J Biochem.* 26 (4): 469-477.
- Gandarillas, H. & Luizaga J. (1969). Número de cromosomas de *Chenopodium quinoa* Willd. en radículas y raicillas. *Turrialba* 17 (3): 275-279.
- Girbes, T., Ferreras, J., Iglesias, R., Citores, L., De Torre, C., Carbajales, M., Jiménez, P., De Benito, F. & Muñoz, R. (1996). Recent advances in the uses and applications of ribosome-inactivating proteins from plants. *Cell Mol Biol.* 42 (4): 461-471.
- Goldstein, I. & Hayes, C. (1978). The lectins: Carbohydrate binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 35: 127-340.
- Grant, G., More, L., Mckenzie, N., Dorward, P., Stewart, J., Telek, Y. & Pusztai, A. (1991). A survey of the nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. *Livestock Research for Rural Development.* Vol. 3, N° 3.
- Guinée, P., Agterberg, C. & Jansen, W. (1972). *Escherichia coli* O antigen typing by means of a mechanized microtechnique. *Appl. Microbiol.* 24:127-131.

- 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.
- Hirabayashi, J., & Kasai, K. (1991). Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *J Biol Chem.* 266 (35): 23648-23653.
- Hoffman, L. & Donaldson, D. (1985) Characterization of two *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome. *EMBO J.* 4: 883-889.
- 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.
- Huesing, J., Murdock, L. & Shade, R. (1991a). Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. *Phytochemistry.* 30: 785-788.
- Huesing, J., Murdock, L. & Shade, R. (1991b). Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry.* 30: 3565-3568.
- Hynes, S., Hirno, S., Wadström, T. & Moran, A. (1999). Differentiation of *Helicobacter pylori* isolates based on lectin binding of cell extracts in an agglutination assay. *Journal of Clinical Microbiology.* 37 (6): 1994-1998.
- INIA (1997). "El cultivo de quinua *Chenopodium quinoa* Wild". Serie plegable N° 7-97. Lima-Perú.
- Jiro, D., Silva, J., Novello, J. & Marangoni, S. (2002). Purificação, caracterização bioquímica e funcional de lectinas em sementes de *Chenopodium quinoa*. X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP. Brazil.
- Kini, R. (1996). Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins?. *Toxicon.* 34 (11-12): 1287-1294.
- Kolberg, J. & Sletten, K. 1982 Purification and properties of a mitogenic lectin from *Lathyrus sativus* seeds. *Biochim Biophys Acta.* 704 (1): 26-30.
- Konishi, Y., Hirano, S., Tsuboi, H. & Wada, M. (2004). Distribution of minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (1): 231-234.
- Koziol, M. (1992). Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J. Food Comp. Anal.* 5: 35-68.
- 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.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J. & Denarie, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated γ acylated of glucosamina oligosaccharide signal. *Nature*. 344: 781-784.
- Lis, H. & Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annu Rev Biochem*. 55: 35-67.
- Lis, H. & Sharon, N. (1987). Erythrina lectins. *Methods Enzymol*. 138: 544-551.
- Loris, R. (2002). Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*. 1572: 198-208.
- Mujica, A. (1997). Cultivo de Quinua. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Serie Manual RI N° 1-97. Lima-Perú.
- Murdock, L., Huesing, J., Nielsen, S., Pratt, R. & Shade, R. (1990). Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*. 29: 85-89.
- Nicholls, C. & Mulley, J. (1982). Distribution of the GC (group-specific component) subtypes in cord bloods and blood donors. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 60 (4): 427-431.
- Nowak, T., Haywood, P. & Barondes, S. (1976). Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 68 (3): 650-657.
- Oliveira, J., Melo, V., Camara, M., Vasconcelos, I., Beltramini, L., Machado, O., Gomes, V., Pereira, S., Fernández, C., Nunes, E., Monteiro, A. (2001). Purification and physicochemical characterization of a legume lectin from *Luetzelburgia auriculata*. 19th INTERLEC. Brazil.
- Olsson, M. & Chester, M. (2001). Polymorphism and recombination events at the ABO locus: a major challenge for genomic ABO blood grouping strategies. *Transfusion Medicine*. 11 (4): 295-313.
- Osborn, T., Alexander, D., Sun, S., Cardone, C. & Bliss, F. (1988). Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*. 240: 207-210.
- Ozeki, Y., Matsui, T. & Titani, K. (1991). Cell adhesive activity of two animal lectins through different recognition mechanisms. *FEBS Lett*. 289 (2): 145-147.
- Ozeki, Y., Tazawa, E. & Matsui, T. (1997). D-galactoside-specific lectins from the body wall of an echiuroid (*Urechis unicinctus*) and two annelids (*Neanthes japonica* and *Marphysa sanguinea*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 118 (1): 1-6.
- Pereira, M., Melo, F., Silveira, V., Nascimento, A. & Benevides, N. (2001). Purification and partial characterization of the lectin from the alga *Ulva fasciata*. 19th INTERLEC. Brazil.

- Peumans, W. & Van Damme, E. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109 (2): 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. (2001). Taxonomical distribution of plant lectins. 19th INTERLEC. Brazil.
- Poretz, R., Tang, M. & Vucenik, I. (1986). The separation of lymphocyte subpopulations with lectins. *Immunol Invest.* 15 (6): 521-529.
- Portugal, M., Silva, J., Novello, J. & Marangoni, S. (2002). Estudo da atividade mitogênica da lectina de sementes de *Chenopodium quinoa* (Cqlec) sobre linfócitos e seu encapsulamento em lipossomos. X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP. Brazil.
- Prakash, D., Nath, P. & Pal, M. (1993). Composition, variation of nutritional contents in leaves, seed protein, fat and fatty acid profile of *Chenopodium* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 62: 203-205.
- Prego, I., Maldonado, S. & Otegui, M. (1998) Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany.* 82: 481-488.
- Pusztai, A., Ewen, S., Grant, G., Peumans, W., Van Damme, E., Rubio, L. & Bardocz, S. (1990). The relationship between survival and binding of plant lectins during small intestine passage and their effectiveness as growth factors. *Digestion.* 46: 308-316.
- Pusztai, A., Ewen, S., Grant, G., Brown, D., Stewart, J., Peumans, W., Van Damme, E. & Bardocz, S. (1993). Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *Br J Nutr.* 70: 313-321.
- Ramos, M., Bomfim, L., Becerra, L., Cavada, B., Alencar, N., Santos, C., Grangeiro, T. & Debray, H. (2001). Further characterization of the glycan binding specificity of the lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. 19th INTERLEC. Brazil.
- Ranhotra, G., Gelroth, J., Glaser, B., Lorens, K. & Johnson, D. (1993) Composition and nutritional quality of quinoa. *Cereal Chemistry.* 70: 303-305.
- Rossmann, M. & Argos, P. (1981). Protein Folding. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 497-532.
- Ruales, J. & Nair, B. (1993). Content of fat, vitamins and minerals in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. *Food Chemistry.* 48: 131-136.
- Sakakibara, F., Kawauchi, H. & Takayanagi, G. (1985). Blood group B-specific lectin of *Plecoglossus altivelis* (Ayu fish) eggs. *Biochim Biophys Acta.* 841 (1): 103-111.
- Sanabria, E., Vega, N. & Pérez, G. (2001). Isolation and characterization of a lectin from *Lepechinia bullata* seeds. 19th INTERLEC. Brazil.

- Schalla, W., Rice, R., Biddle, J., Jeanlouis, Y., Larsen, S. & Whittington, W. (1985). Lectin characterization of gonococci from an outbreak caused by penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol.* 22 (4): 481-483.
- Schlumbaum, A., Mauch, F., Vögeli, U. & Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature.* 324: 365-367.
- Sequeira, L. & Graham, T. (1977). Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. *Physiol Plant Pathol.* 11: 43-54.
- Sharon, N. (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv Immunol.* 34: 213-298.
- Sharon, N. (1993). Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem Sci.* 18 (6): 221-226.
- Sharon, N. & Lis, H. (1972). Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.* 177 (53): 949-959.
- Sharon, N. & Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 246 (4927): 227-234.
- Shewry, P., Napier, J. & Tatham, A. (1995). Seed storage proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 945-956.
- Sinclair, T., Purcell, L. & Sneller, C. (2004). Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends Plant Sci.* 9 (2): 70-75.
- Swiss Prot: www.ncbi.nlm.nih.gov
- Taylor, M. & Drickamer, K. (1993). Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem.* 268 (1): 399-404.
- 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.
- Ueno, M., Ogawa, H., Matsumoto, I. & Seno, N. (1991). A novel mannose-specific and sugar specifically aggregatable lectin from the bark of the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). *J. Biol. Chem.* 266 (5): 3146-3153.
- Van Damme, E., Barre, A., Bemer, V., Rouge, P., Van Leuven, F. & Peumans, W. (1995). A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). *Plant Mol. Biol.* 29 (3): 579-598.
- Van Damme, E., Barre, A., Rouge, P. & Peumans, W. (1997a). Molecular cloning of the bark and seed lectins from the 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.
- Van Parijs, J., Broekaert, W., Goldstein, I. & Peumans, W. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Plant.* 183: 258-262.
- Van Parijs, J., Joosen, H., Peumans, W., Geuns, J. & Van Laere, A. (1992). Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Arch. Microbiol.* 158: 19-25.
- Varriano-Marston E. y De Francisco A. 1984 Ultrastructure of quinoa fruti (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Microstruct.* 3: 165-173.
- Vilarrubia, O., Dubet, M., Menéndez, J., De la Fuente, J. y Noa, E. (1995). Estudios de 2 preparados de fitohemaglutinina obtenidos por diferentes métodos. *Rev. Cienc. Biol.* (en prensa).
- Villacorta, L. & Talavera, V. (1976). Anatomía del grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) *Anales científicos.* Vol. XIV: 39-45. Universidad Nacional Agraria. Lima - Perú.
- Wilson, H. (1988). Allozyme variation and morphological relationships of *Chenopodium hircinum*. *Syst. Bot.* 13 (2): 215 – 228.
- Wu, C., Lu, H., Bao, J., Long, H. & Wang, K. (2001). Purification and characterization of *Zephyranthes canadia* herb lectin. 19th INTERLEC. Brazil.
- Yamamoto, K., Konami, Y. & Irimura, T. (1997). Sialic acid-binding motif of *Maackia amurensis* lectins. *J. Biochem.* 121 (4): 756-761.
- Yan, B., Ma, Z., Wang, L., Chai, H. & Huang, X. (2000). Direct Submission. Submitted (05-JUL-2000) Biotechnology Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, P.R. China.
- Zatta, P., Nyame, K., Cormier, M., Mattox, S., Prieto, P., Smith, D. & Cummings, R. (1991). A solid-phase assay for beta-1,4-galactosyltransferase activity in human serum using recombinant aequorin. *Anal Biochem.* 194 (1): 185-191.
- 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.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado del análisis de calidad de semillas de quinua realizado en la Estación Experimental Illpa-INIA (Puno) entre las que se encuentra el cv. Salcedo-INIA

**INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN AGRARIA
ESTACION EXPERIMENTAL
ILLPA**

ANALISIS DE CALIDAD EN SEMILLAS

| | |
|------------------------|--|
| SOLICITANTE | : INIA Estación Experimental Illpa Puno. |
| INTERESADO | : PPROSYR. |
| PROCEDENCIA | : Puno (Yunguyo - Tahuaco). |
| PRODUCTO | : Semilla de Quinua. |
| VARIEDAD | : Varios. |
| TIPO DE ANÁLISIS | : Análisis de Germinación de Semillas. |
| N° DE ANÁLISIS | : 03. |
| FECHA DE RECEPCIÓN | : 17 de Julio del 2002. |
| FECHA DE CERTIFICACIÓN | : 10 de Agosto del 2002. |
| N° DE CERTIFICADO | : 257Las. |

| Variedad | Pureza varietal % | Poder Germinativo % | Energía germinativa | Humedad % | Valor Real % |
|----------------|-------------------|---------------------|---------------------|-----------|--------------|
| Salcedo INIA | 98 | 98 | Buena | 13.00 | 96 |
| Blanca de Juli | 99 | 98 | Buena | 12.80 | 97 |
| Kancolla | 98 | 97 | Buena | 12.50 | 95 |

Observaciones.-Ninguna.

Energía germinativa : Buena .

Nota .- Cualquier corrección y/o enmendadura anula al presente documento



INIA
ESTACION EXPERIMENTAL ILLPA - PUNO

[Handwritten Signature]

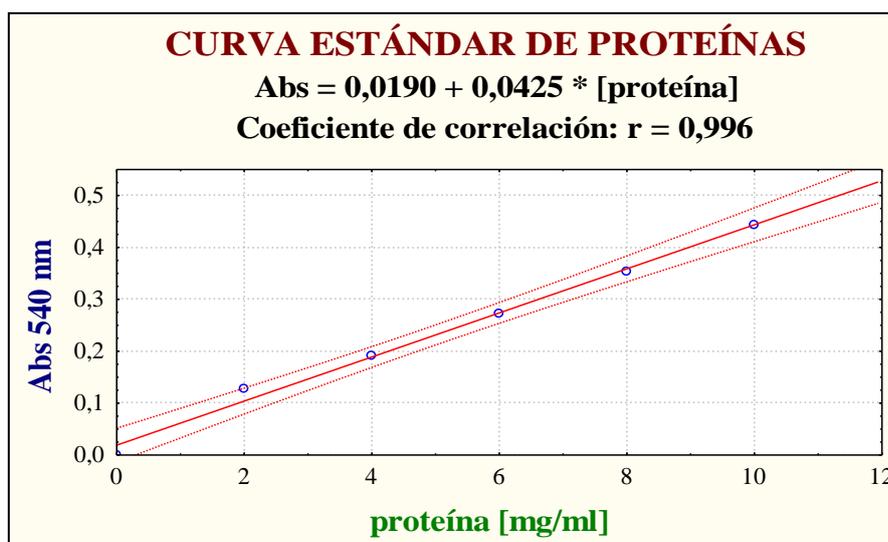
Ing° JORGE CANIHUA ROJAS
Jefe Laboratorio Analisis
SALCEDO

Anexo 2. Determinación de la curva estándar de proteínas y el método de Biuret

Curva estándar de proteínas

A una cantidad de proteína (seroalbúmina bovina) en un rango comprendido entre 2 a 10 mg se le adicionó NaOH 1N para obtener un volumen final de 1.0 ml. Luego se le agrega 4,0 ml del reactivo de Biuret (1,5 g de $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6 g de $\text{NaKC}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, y 300 ml de NaOH 10%, enrasado a 1000 ml con agua destilada). Se mezcla y se deja en reposo por 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se lee a 540 nm frente a un blanco. Esto sirvió para calcular el Factor de calibración (Fc) dado por la siguiente fórmula:

$$Fc = \frac{\text{Concentración del estándar}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$



| seroalbúmina (10 mg/ml) | NaOH (1N) | p° [mg/ml] | Abs | Abs corregida | Fc corregido |
|-------------------------|-----------|------------|-------|---------------|--------------|
| 0 ml | 1 ml | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,2 | 0,8 | 2 | 0,128 | 0,104 | 19,23 |
| 0,4 | 0,6 | 4 | 0,192 | 0,189 | 21,16 |
| 0,6 | 0,4 | 6 | 0,272 | 0,274 | 21,89 |
| 0,8 | 0,2 | 8 | 0,352 | 0,359 | 22,28 |
| 1,0 | 0,0 | 10 | 0,444 | 0,444 | 22,52 |
| | | | | | Fc promedio |
| | | | | | 20,75 |

Método de Biuret

Se toma 0,1 ml de la muestra problema y se completa a 1,0 ml con NaOH 1 N, se añade 4,0 ml del reactivo de Biuret, se agita y se deja en reposo durante 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se lee a 540 nm frente a un blanco que contiene 1,0 ml de NaOH 1N y 4,0 ml del reactivo de Biuret. La cantidad de proteína (mg/ml) en la muestra problema se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{mg/ml} = Fc \times \text{Absorbancia}$$

Anexo 3. Cuadro de datos del perfil cromatográfico llevado a cabo sobre Sephadex G-100 en la cual se muestran las absorbancias (Abs) medidas a 540 nm así como sus correspondientes valores de proteínas (p°) expresadas en mg/ml, determinadas por el método de Biuret. Los valores remarcados en negrita corresponden al pico 5 que tiene actividad hemaglutinante.

| | | | | | | | | | | | |
|------|-------|-------|----|-------|--------|----|--------------|--------------|-----|--------------|---------------|
| tubo | Abs | p° | 35 | 0,380 | 7,885 | 70 | 0,870 | 18,053 | 105 | 0,240 | 4,980 |
| 1 | 0,000 | 0,000 | 36 | 0,560 | 11,620 | 71 | 0,890 | 18,468 | 106 | 0,270 | 5,603 |
| 2 | 0,000 | 0,000 | 37 | 0,760 | 15,770 | 72 | 0,950 | 19,713 | 107 | 0,280 | 5,810 |
| 3 | 0,000 | 0,000 | 38 | 0,820 | 17,015 | 73 | 1,100 | 22,825 | 108 | 0,290 | 6,018 |
| 4 | 0,000 | 0,000 | 39 | 0,860 | 17,845 | 74 | 1,780 | 36,935 | 109 | 0,300 | 6,225 |
| 5 | 0,000 | 0,000 | 40 | 0,865 | 17,949 | 75 | 2,070 | 42,953 | 110 | 0,330 | 6,848 |
| 6 | 0,000 | 0,000 | 41 | 0,845 | 17,534 | 76 | 2,160 | 44,820 | 111 | 0,340 | 7,055 |
| 7 | 0,000 | 0,000 | 42 | 0,820 | 17,015 | 77 | 2,260 | 46,895 | 112 | 0,370 | 7,678 |
| 8 | 0,000 | 0,000 | 43 | 0,750 | 15,563 | 78 | 2,140 | 44,405 | 113 | 0,380 | 7,885 |
| 9 | 0,000 | 0,000 | 44 | 0,520 | 10,790 | 79 | 1,880 | 39,010 | 114 | 0,400 | 8,300 |
| 10 | 0,000 | 0,000 | 45 | 0,320 | 6,640 | 80 | 1,480 | 30,710 | 115 | 0,440 | 9,130 |
| 11 | 0,000 | 0,000 | 46 | 0,260 | 5,395 | 81 | 1,060 | 21,995 | 116 | 0,490 | 10,168 |
| 12 | 0,000 | 0,000 | 47 | 0,260 | 5,395 | 82 | 0,580 | 12,035 | 117 | 0,460 | 9,545 |
| 13 | 0,000 | 0,000 | 48 | 0,290 | 6,018 | 83 | 0,460 | 9,545 | 118 | 0,488 | 10,126 |
| 14 | 0,000 | 0,000 | 49 | 0,330 | 6,848 | 84 | 0,260 | 5,395 | 119 | 0,680 | 14,110 |
| 15 | 0,000 | 0,000 | 50 | 0,390 | 8,093 | 85 | 0,180 | 3,735 | 120 | 0,720 | 14,940 |
| 16 | 0,000 | 0,000 | 51 | 0,440 | 9,130 | 86 | 0,140 | 2,905 | 121 | 0,690 | 14,318 |
| 17 | 0,000 | 0,000 | 52 | 0,490 | 10,168 | 87 | 0,130 | 2,698 | 122 | 0,660 | 13,695 |
| 18 | 0,000 | 0,000 | 53 | 0,540 | 11,205 | 88 | 0,120 | 2,490 | 123 | 0,500 | 10,375 |
| 19 | 0,000 | 0,000 | 54 | 0,570 | 11,828 | 89 | 0,110 | 2,283 | 124 | 0,390 | 8,093 |
| 20 | 0,000 | 0,000 | 55 | 0,560 | 11,620 | 90 | 0,110 | 2,283 | 125 | 0,280 | 5,810 |
| 21 | 0,000 | 0,000 | 56 | 0,540 | 11,205 | 91 | 0,110 | 2,283 | 126 | 0,200 | 4,150 |
| 22 | 0,000 | 0,000 | 57 | 0,480 | 9,960 | 92 | 0,110 | 2,283 | 127 | 0,160 | 3,320 |
| 23 | 0,000 | 0,000 | 58 | 0,580 | 12,035 | 93 | 0,100 | 2,075 | 128 | 0,130 | 2,698 |
| 24 | 0,000 | 0,000 | 59 | 0,640 | 13,280 | 94 | 0,120 | 2,490 | 129 | 0,090 | 1,868 |

| | | |
|----|-------|-------|
| 25 | 0,000 | 0,000 |
| 26 | 0,000 | 0,000 |
| 27 | 0,000 | 0,000 |
| 28 | 0,010 | 0,208 |
| 29 | 0,020 | 0,415 |
| 30 | 0,040 | 0,830 |
| 31 | 0,070 | 1,453 |
| 32 | 0,100 | 2,075 |
| 33 | 0,150 | 3,113 |
| 34 | 0,230 | 4,773 |

| | | |
|----|-------|--------|
| 60 | 0,740 | 15,355 |
| 61 | 0,790 | 16,393 |
| 62 | 0,840 | 17,430 |
| 63 | 0,920 | 19,090 |
| 64 | 0,950 | 19,713 |
| 65 | 0,970 | 20,128 |
| 66 | 0,960 | 19,920 |
| 67 | 0,960 | 19,920 |
| 68 | 0,930 | 19,298 |
| 69 | 0,880 | 18,260 |

| | | |
|-----|--------------|--------------|
| 95 | 0,130 | 2,698 |
| 96 | 0,130 | 2,698 |
| 97 | 0,135 | 2,801 |
| 98 | 0,140 | 2,905 |
| 99 | 0,150 | 3,113 |
| 100 | 0,160 | 3,320 |
| 101 | 0,170 | 3,528 |
| 102 | 0,190 | 3,943 |
| 103 | 0,220 | 4,565 |
| 104 | 0,230 | 4,773 |

| | | |
|-----|--------------|--------------|
| 130 | 0,075 | 1,556 |
| 131 | 0,042 | 0,872 |
| 132 | 0,025 | 0,519 |
| 133 | 0,010 | 0,208 |
| 134 | 0,010 | 0,208 |
| 135 | 0,005 | 0,104 |
| 136 | 0,005 | 0,104 |

$$p^{\circ} = \text{Abs} \times Fc$$

Abs promedio: **0,277**

Proteína: **5,755** mg/ml

Anexo 4. Cuadro de datos del perfil cromatográfico llevado a cabo sobre Sephadex G-75 en la cual se muestran las absorbancias (Abs) medidas a 540 nm así como sus correspondientes valores de proteínas (p°) expresadas en mg/ml, determinadas por el método de Biuret. Los valores remarcados en negrita corresponden a la fracción IV que tiene actividad hemaglutinante.

| tubo | Abs | p° | | | |
|------|-------|--------|----|--------------|---------------|
| 1 | 0,006 | 0,125 | 26 | 0,142 | 2,947 |
| 2 | 0,005 | 0,104 | 27 | 0,436 | 9,047 |
| 3 | 0,005 | 0,104 | 28 | 1,496 | 31,042 |
| 4 | 0,005 | 0,104 | 29 | 0,623 | 12,927 |
| 5 | 0,005 | 0,104 | 30 | 0,320 | 6,640 |
| 6 | 0,070 | 1,453 | 31 | 0,120 | 2,490 |
| 7 | 0,120 | 2,490 | 32 | 0,134 | 2,781 |
| 8 | 0,630 | 13,073 | 33 | 0,326 | 6,765 |
| 9 | 0,080 | 1,660 | 34 | 0,740 | 15,355 |
| 10 | 0,035 | 0,726 | 35 | 1,670 | 34,653 |
| 11 | 0,013 | 0,270 | 36 | 0,320 | 6,640 |
| 12 | 0,016 | 0,332 | 37 | 0,023 | 0,477 |
| 13 | 0,012 | 0,249 | 38 | 0,023 | 0,477 |
| 14 | 0,012 | 0,249 | 39 | 0,023 | 0,477 |
| 15 | 0,012 | 0,249 | 40 | 0,030 | 0,623 |
| 16 | 0,013 | 0,270 | 41 | 0,045 | 0,934 |
| 17 | 0,012 | 0,249 | 42 | 0,070 | 1,453 |
| 18 | 0,008 | 0,166 | 43 | 0,200 | 4,150 |
| 19 | 0,008 | 0,166 | 44 | 1,600 | 33,200 |
| 20 | 0,001 | 0,025 | 45 | 0,300 | 6,225 |
| 21 | 0,023 | 0,477 | 46 | 0,089 | 1,847 |
| 22 | 0,023 | 0,477 | 47 | 0,043 | 0,892 |
| | | | 48 | 0,023 | 0,477 |

| | | |
|----|-------|-------|
| 23 | 0,040 | 0,830 |
| 24 | 0,056 | 1,162 |
| 25 | 0,076 | 1,577 |

| | | |
|----|-------|-------|
| 49 | 0,012 | 0,249 |
| 50 | 0,008 | 0,166 |
| 51 | 0,008 | 0,166 |

$$p^{\circ} = \text{Abs} \times Fc$$

Abs promedio: **0,267**

Proteína: **5,533** mg/ml

Anexo 5. Cuadro de datos del perfil cromatográfico llevado a cabo por HPLC de fase reversa en la cual se muestran los tiempos (min) de elución proteica, así como las absorbancias (Abs) medidas a 280 nm. El valor remarcado en negrita corresponde al pico 5 que tiene actividad hemaglutinante.

| | | | | | |
|--------|-------|------|-------|-------------|--------------|
| tiempo | Abs | 14,8 | 0,003 | 30,0 | 0,054 |
| 0,0 | 0,001 | 15,2 | 0,005 | 30,4 | 0,125 |
| 0,4 | 0,002 | 15,6 | 0,002 | 30,8 | 0,363 |
| 0,8 | 0,001 | 16,0 | 0,004 | 31,2 | 0,068 |
| 1,2 | 0,002 | 16,4 | 0,008 | 31,6 | 0,290 |
| 1,6 | 0,005 | 16,8 | 0,004 | 32,0 | 0,900 |
| 2,0 | 0,006 | 17,2 | 0,007 | 32,4 | 0,230 |
| 2,4 | 0,003 | 17,6 | 0,005 | 32,8 | 0,075 |
| 2,8 | 0,002 | 18,0 | 0,007 | 33,2 | 0,026 |
| 3,2 | 0,001 | 18,4 | 0,005 | 33,6 | 0,012 |
| 3,6 | 0,003 | 18,8 | 0,007 | 34,0 | 0,007 |
| 4,0 | 0,002 | 19,2 | 0,007 | 34,4 | 0,007 |
| 4,4 | 0,005 | 19,6 | 0,005 | 34,8 | 0,006 |
| 4,8 | 0,006 | 20,0 | 0,006 | 35,2 | 0,005 |
| 5,2 | 0,003 | 20,4 | 0,007 | 35,6 | 0,008 |
| 5,6 | 0,002 | 20,8 | 0,005 | 36,0 | 0,001 |
| 6,0 | 0,005 | 21,2 | 0,004 | 36,4 | 0,004 |
| 6,4 | 0,012 | 21,6 | 0,005 | 36,8 | 0,003 |
| 6,8 | 0,006 | 22,0 | 0,008 | 37,2 | 0,008 |
| 7,2 | 0,007 | 22,4 | 0,004 | 37,6 | 0,008 |
| 7,6 | 0,009 | 22,8 | 0,006 | 38,0 | 0,003 |
| 8,0 | 0,015 | 23,2 | 0,008 | 38,4 | 0,007 |
| 8,4 | 0,012 | 23,6 | 0,005 | 38,8 | 0,003 |
| 8,8 | 0,005 | 24,0 | 0,004 | 39,2 | 0,007 |
| 9,2 | 0,002 | 24,4 | 0,003 | 39,6 | 0,007 |
| 9,6 | 0,003 | 24,8 | 0,008 | 40,0 | 0,005 |

| | | | | | |
|------|-------|------|-------|------|-------|
| 10,0 | 0,008 | 25,2 | 0,009 | 40,4 | 0,004 |
| 10,4 | 0,004 | 25,6 | 0,005 | 40,8 | 0,003 |
| 10,8 | 0,004 | 26,0 | 0,003 | 41,2 | 0,002 |
| 11,2 | 0,008 | 26,4 | 0,004 | 41,6 | 0,007 |
| 11,6 | 0,009 | 26,8 | 0,005 | 42,0 | 0,009 |
| 12,0 | 0,003 | 27,2 | 0,008 | 42,4 | 0,007 |
| 12,4 | 0,004 | 27,6 | 0,004 | 42,8 | 0,004 |
| 12,8 | 0,004 | 28,0 | 0,004 | 43,2 | 0,003 |
| 13,2 | 0,003 | 28,4 | 0,004 | 43,6 | 0,002 |
| 13,6 | 0,006 | 28,8 | 0,007 | 44,0 | 0,007 |
| 14,0 | 0,001 | 29,2 | 0,008 | 44,4 | 0,007 |
| 14,4 | 0,005 | 29,6 | 0,050 | 44,8 | 0,007 |
| | | | | 45,2 | 0,002 |

Anexo 6. Datos crudos, ANOVA y prueba de Tukey correspondientes al efecto insecticida de la CqLEC sobre larvas de *Symmetrischema plaesiosema* expresados en horas de mortalidad después de aplicado el tratamiento.

| larva | tratamiento (ppm) | | | |
|-------|-------------------|-----|-----|-----|
| | 1000 | 500 | 250 | 125 |
| 1 | 16 | 24 | 34 | 48 |
| 2 | 17 | 26 | 37 | 50 |
| 3 | 16 | 28 | 35 | 55 |
| 4 | 18 | 27 | 38 | 56 |
| 5 | 17 | 26 | 36 | 52 |
| 6 | 15 | 29 | 39 | 54 |
| 7 | 14 | 28 | 37 | 53 |
| 8 | 19 | 27 | 38 | 52 |
| 9 | 17 | 27 | 39 | 51 |

ANOVA

| FV | GL | SC | CM | Fc | Ft | Significancia |
|-------------|----|-----------|-----------|----------|------|---------------|
| Tratamiento | 3 | 6276,5278 | 2092,1759 | 613,5913 | 2,90 | P < 0,05 |
| Error | 32 | 109,1111 | 3,4097 | | | |
| Total | 35 | 6385,6389 | | | | |

CV = 5,56

Prueba de especificidad de Tukey

| Tratamiento | Promedio | Significancia |
|-------------|----------|---------------|
| 1000 | 16,56 | a |
| 500 | 26,89 | b |
| 250 | 37,00 | c |
| 125 | 52,33 | |

Este libro se terminó de publicar en la editorial

**Instituto Universitario
de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú**



ISBN: 978-612-5069-12-2



EDITADA POR
INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE INNOVACIÓN CIENCIA
Y TECNOLOGÍA INUDI PERÚ