





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**Facultad de Ciencias Químico Biológicas**  
**Unidad Académica De Ciencias De La Tierra**  
**MAESTRÍA EN BIOCENCIAS**



**Actividad aglutinante y citotóxica de una  
fracción proteica obtenida del pericarpio de  
tuna de *Opuntia ficus-indica***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRÍA EN BIOCENCIAS**

**QUE PRESENTA:**

**Q.B.P. Lizbeth Tehuitzin Acevedo**

**DIRECTOR**

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame

**CODIRECTOR**

Dr. Javier Jiménez Hernández

Chilpancingo, Gro. Julio del 2017.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA**  
**Maestría en Biociencias**

Av. Lázaro Cárdenas S/N. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. C.P. 38090. Tel 01 747 47 1 93 10 ext 3601

**APROBACIÓN DE TESIS**

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 21 días del mes de junio de dos mil diecisiete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "Actividad aglutinante y citotóxica de una fracción proteica obtenida del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*", presentada por la alumna Lizbeth Tehuitzin Acevedo, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

**El Comité Tutorial**

Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame  
Dirección de tesis

Dr. Javier Juárez Hernández  
Codirección de tesis

Dra. Yaneth Castro Coronel

Dra. Yanet Romero Ramírez

Dr. Enrique García Hernández

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



**UAGro**  
Coordinación del  
Posgrado de la FCQB

Vo. Bo

**Coordinación 2014-2018**

Dra. Isela Parra Rojas

Coordinadora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



**UAGro**  
Unidad Académica de  
Ciencias Químico Biológicas

Vo. Bo

**DIRECCIÓN 2014 - 2018**

Dra. Amalia Vences Velázquez

Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, Termodinámica y Estructura de Proteínas perteneciente a la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, bajo la dirección del Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame y la codirección del Dr. Javier Jiménez Hernández; así como en el Departamento de Química de Biomacromoléculas perteneciente al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la asesoría del Dr. Enrique García Hernández.

Este trabajo forma parte de la LGAC en biotecnología de la Maestría en Biociencias.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través de una Beca de manutención otorgada núm. 573826.

A los proyectos PROMEP (F-PROMEP-38/Rev-03, SEP-23-005) y CONACyT-SEP CB No. 178507.

A la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, institución en la cual se cursaron los créditos del posgrado en Biociencias.

Al Instituto de Química perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se llevó a cabo la realización de una estancia de investigación.

Al Instituto Nacional de Cancerología dependiente de la Secretaría de Salud por el apoyo otorgado con referente a las líneas celulares utilizadas en el presente proyecto.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) por su disposición de apoyo técnico y equipo.

Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAV) por la capacitación recibida y la donación de muestra (sangre de conejo) para la estandarización de técnicas en este trabajo.



## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

Alcanzar esta nueva meta merece dar especial reconocimiento a las personas que sirvieron de apoyo y colaboraron para la realización de este trabajo. En primera instancia se agradece infinitamente al Dr. Eneas Alejandro Chavelas Adame, asesor de este proyecto de investigación, por motivar a mi persona para siempre ir por la constante mejora, brindarme su confianza, paciencia y conocimiento.

Al comité tutorial: Dr. Javier Jiménez Hernández, Dr. Enrique García Hernández, Dra. Yanet Romero Ramírez y Dra. Yaneth Castro Coronel que estuvieron pendientes de la evolución y consolidación del proyecto con comentarios y sugerencias, así como con su disposición y compromiso.

El más grande y sincero agradecimiento a mis padres: Sergio Tehuitzin Miranda y Teodora Acevedo Chávez, que siempre han brindado su apoyo incondicional y que de alguna forma este logro también es parte de ustedes, y en donde incluyo a mis hermanos y familiares.

Agradezco su continuo apoyo a: María, Ilse, Juana, Amparo, Victor, Remberto, Alma, Augusto y Marbella, con su amistad que se sigue cultivando constantemente, al mismo tiempo agradezco a mis compañeros de posgrado: Juan Carlos, Joseph, Itzel, Maggie, Adán y Diana por la retroalimentación brindada y la formación de un lazo de amistad.

Al M. en C. Carlos César Patiño Morales y la Q.F.B. Sara Abigail Ramírez Cortés por las atenciones y asesorías dadas en la estancia de investigación, así como a las personas que conocí en ella y que me brindaron su conocimiento. Por último, a mis compañeros de laboratorio con los cuales compartí espacio y momentos agradables.

A todos y a cada uno de los antes mencionados, muchas gracias.

PD: *Carpe diem*



## CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract .....	2
Introducción .....	2
Justificación.....	7
Objetivos .....	8
General.....	8
Específicos .....	8
Material y métodos.....	9
Material biológico y reactivos.....	9
Obtención de fracciones proteicas.....	9
Cuantificación de proteínas.....	10
Electroforesis SDS-PAGE.....	10
Ensayos de aglutinación.....	10
Ensayos de inhibición de la aglutinación con carbohidrato.....	11
Ensayos de citotoxicidad.....	11
Análisis de resultados.....	12
Resultados .....	13
Fracción al 30-60 % de saturación.....	13
Ensayos de aglutinación .....	13
Ensayos de citotoxicidad .....	13
Fracción del 80-100 % de saturación.....	15
Obtención de fracciones proteicas y cuantificación.....	15
Ensayos de aglutinación.....	16
Ensayos de inhibición de la aglutinación.....	17
Ensayos de citotoxicidad.....	17
Discusión .....	20
Conclusiones .....	24
Referencias.....	25
Anexos.....	29



<b>Índice de figuras</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ensayo de aglutinación con líneas celulares	29
Figura 2. Efecto citotóxico en cultivos con la fracción de 30-60 % o WGA a diferentes tiempos de incubación y concentraciones	14
Figura 3. Perfil proteico de las fracciones obtenidas del pericarpio de tuna <i>Opuntia ficus-indica</i> .	16
Figura 4. Ensayo de aglutinación con eritrocitos humanos	30
Figura 5. Ensayo de Inhibición de la aglutinación con GlcNAc en eritrocitos humanos O <sup>+</sup>	31
Figura 6. Viabilidad de la línea celular HeLa incubada con diferentes fracciones	18
Figura 7. Viabilidad de la línea celular C-33A incubada con diferentes fracciones	19
Figura 8. Ensayo de inhibición de la aglutinación en la línea celular C-33A.	32
<b>Índice de tablas</b>	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Actividad aglutinante en fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de <i>Opuntia ficus-indica</i> en líneas celulares provenientes de cáncer cervical.	13
Tabla 2. Actividad aglutinante en fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de <i>Opuntia ficus-indica</i> en eritrocitos humanos O <sup>+</sup>	16
Tabla 3. Inhibición de la aglutinación con carbohidratos de las fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de <i>Opuntia ficus-indica</i> .	17
Tabla 4. Estructuras de los carbohidratos reconocidos por las fracciones proteicas.	33



## Resumen

**Antecedentes.** Las lectinas son proteínas o glicoproteínas con amplia variedad estructural y funcional, tienen una interacción específica hacia carbohidrato, no poseen actividad enzimática, ni son producto de un estímulo antigénico. Por su reconocimiento específico a carbohidrato tienen la capacidad de aglutinar células y algunas tienen efecto citotóxico hacia células cancerosas. **Objetivos.** Identificar la presencia de proteínas tipo lectina del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*, en fracciones obtenidas a diferente concentración de sulfato de amonio que posean actividad aglutinante y citotóxica. **Material y métodos.** Se obtuvieron fracciones proteicas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica* mediante saturación con sulfato de amonio a distintas concentraciones. A dichas fracciones se les evaluó su actividad aglutinante con eritrocitos humanos. Aquellas fracciones que presentaron aglutinación (ET y fracción del 80-100 % de saturación) se le determinó su especificidad de interacción a partir de ensayos de inhibición de la aglutinación con carbohidratos. Finalmente, se les evaluó actividad citotóxica mediante ensayos de viabilidad usando el reactivo MTT en líneas celulares provenientes de cáncer cervical (HeLa y C-33A). **Resultados.** Se identificó una fracción de interés, la cual fue obtenida del 80-100 % saturación. La fracción mostró actividad aglutinante en eritrocitos humanos O<sup>+</sup> (actividad específica de 66.0 UHA/mg de proteína) y se determinó que presentó especificidad para GlcNAc y SiA (400 y 200 mM respectivamente). Asimismo, presentó actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorigénicas provenientes de cáncer cervical (HeLa y C-33A) disminuyendo hasta un 30 % su viabilidad, esta disminución fue estadísticamente significativa en comparación con los cultivos a los cuales no se les aplicó tratamiento. **Conclusiones.** Se confirma que en el pericarpio de tuna *Opuntia ficus-indica*, en la fracción del 80-100 % de saturación, existe la presencia de una proteína tipo lectina que posee actividad aglutinante, presenta especificidad para GlcNAc y SiA y posee una actividad citotóxica en líneas celulares provenientes de cáncer cervical. Todos estos datos caracterizan a las hemaglutininas (lectinas) presentes en plantas.

**Palabras clave:** *Opuntia ficus-indica*, lectina, aglutinación, citotoxicidad.



## Abstract

**Background.** Lectins are proteins or glycoproteins with wide structural and functional variety, have a specific interaction toward carbohydrate, they do not have enzymatic activity and are not the product of an antigenic stimulus. Due to their specific recognition to carbohydrate have the ability to bind cells and sometimes they have cytotoxic effect in cancer cells. **Aim.** To Identify the presence of protein lectin-type from pericarp prickly pear of *Opuntia ficus-indica*, in fractions obtained with different concentration of ammonium sulphate that have agglutinating and cytotoxic activity. **Material and methods.** Protein fractions were obtained from the pericarp to prickly pear of *Opuntia ficus-indica* by saturation with ammonium sulfate to different concentrations. To these fractions were evaluated their agglutinating activity on human erythrocytes. The fractions that showed agglutination (TE and fraction of the 80-100 % saturation) was determined their specificity of interaction with agglutination inhibition assay using carbohydrates. Finally, cytotoxic activity was assessed by viability assays using the MTT reagent in cervical cancer cell lines (HeLa and C-33A). **Results.** We found a fraction of interest, which was obtained in the 80-100 % saturation. This protein fraction showed agglutinating activity to O<sup>+</sup> human erythrocytes (specific activity of 66.0 UHA/mg protein) and also was specificity for GlcNAc and SiA (400 and 200 mM, respectively). In addition, it presented cytotoxic activity on tumorigenic cell lines derived from cervical cancer (HeLa and C-33A) reducing up to 30% its viability, this decrease was statistically significant in comparison with cultures without treatment. **Conclusions.** It confirmed that the pericarp from prickly pear of *Opuntia ficus-indica*, in the 80-100 % fraction saturation, there is a protein lectin-type with agglutinating activity, which has specificity for GlcNAc and SiA, it also has a cytotoxic activity in cell lines derived from cervical cancer. All these data characterize the hemagglutinin (lectins) present in plants.

**Key words:** *Opuntia ficus-indica*, lectin, agglutination, cytotoxicity.



## Introducción

Las proteínas son macromoléculas, presentes en las células de todos los seres vivos, se definen como polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y participan en un sinnúmero de procesos biológicos, por lo cual son moléculas de gran importancia (Nelson & Cox, 2014). Por su gran número se agrupan en diferentes familias y una de ellas, es la superfamilia de las lectinas, dichas proteínas se ha observado que se encuentran distribuidas ubicuamente en todos los organismos vivos y se caracterizan por poseer la capacidad de reconocimiento específico a mono u oligosacáridos, para diferenciarlas de otros grupos de proteínas con reconocimiento a carbohidratos, se excluyen de las lectinas a aquellas proteínas con actividad catalítica (por ejemplo, enzimas glicohidrolíticas) y a aquellas proteínas que se producen en respuesta a un estímulo antigénico (Peumans & Damme, 1995). La mayoría de ellas son capaces de formar homo oligómeros, que les permite establecer múltiples sitios de contacto a la vez entre receptores de un mismo tipo celular, lo que les permite realizar el efecto de aglutinación celular (Gabiús *et al.*, 2011). En gran medida la fuente de donde se han aislado mayor número de lectinas conocidas son plantas, y en ellas es donde se ha reportado que juegan un papel preponderante en las interacciones simbióticas entre microorganismos fijadores de nitrógeno (*Rhizobium*) y la raíz de la planta (De Vasconcelos *et al.*, 2013; Bajaj *et al.*, 2001), así como en la defensa contra una variedad de microorganismos fitopatógenos (bacterias, virus, hongos), nematodos e insectos (Li-Byarlay *et al.*, 2016; Macedo *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2006). Adicionalmente, se sabe que contribuyen en la germinación de semillas (Cheng *et al.*, 2013), y participan en su ciclo de floración de las mismas (Xiao *et al.*, 2015). Debido al constante aislamiento de nuevas lectinas, así como la variedad estructural y funcional que presentan, es difícil establecer una clasificación general para esta superfamilia y por tanto se han propuesto clasificaciones parciales (por ejemplo, lectinas de plantas y lectinas de origen animal). En la actualidad una de las clasificaciones más usadas es la que considera como rasgos prioritarios de clasificación: - la estructura tridimensional (3D) y los dominios de reconocimiento a carbohidratos (CDRs), resultando así seis subfamilias: (1) lectinas de leguminosas, (2) lectinas de cereales, (3) lectinas de tipo-P, reconocen manosa-6-fosfato,



(4) lectinas de tipo-S, requieren grupos tiol para su estabilidad, (5) lectinas de tipo-C, requieren calcio para efectuar un adecuado reconocimiento, y (6) las pentraxinas, que requieren de calcio para la unión ligando y poseen una estructura aplanada-jelly roll, las dos primeras fueron encontradas en plantas y las restantes en animales (De Hoff *et al.*, 2009; Varki *et al.*, 2009). En cuanto a la clasificación de lectinas en plantas se toma en cuenta su estructura molecular, teniendo así: (1) lectinas de tipo amaranto, (2) lectinas de leguminosas, (3) lectinas con dominio tipo heveína, (4) lectinas tipo RIP, (5) lectinas de monocotiledóneas, (6) lectinas del tipo jacalina y (7) lectinas de floema de cucurbitáceas (Lam & Ng, 2011; Ferriz-Martinez *et al.*, 2010).

En el estudio del cáncer se han descrito que algunas de las lectinas tienen un potencial, tanto en el diagnóstico temprano, como en el tratamiento natural contra dicho padecimiento, esto gracias a que se tiene el conocimiento de que en el proceso de transformación celular del fenotipo nativo al fenotipo carcinogénico, la célula va modificando gradualmente el perfil de glicosilación en su membrana celular, por la alteración de las proteínas que se encargan de este proceso, lo que se traduce en un aumento (acumulación) de glicanos en la membrana celular a medida que se va estableciendo la enfermedad (López-Morales *et al.*, 2010). En adición, se ha descrito que los cambios de glicosilación que presentan las células tumorigénicas preceden a los cambios morfológicos asociados al establecimiento de un tumor sólido y a la metástasis, es por ello que existen lectinas que se han pretendido usar como una herramienta de diagnóstico temprano -en etapas precancerosas- como lo es la lectina de *Amaranthus leucocarpus* (ALL) en el reconocimiento de etapas precancerosas de cáncer cervical (Santaella-Verdejo *et al.*, 2007), la lectina de *Sambucus nigra* (SNA) para el reconocimiento de células de cáncer gástrico (Kurtenkov & Klaamas, 2017), la aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA) en cáncer de pulmón (Serrato *et al.*, 2011), la lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) en cáncer colorrectal (Petrossian *et al.*, 2007), mientras que en cáncer cervicouterino se han utilizado la SNA y la aglutinina de *Machaerocereus eruca* (MeA) (Serrano *et al.*, 2012; Solórzano *et al.*, 2012). Otra posible aplicación para las lectinas en el cáncer, es su uso como tratamiento debido a que existen lectinas que además de reconocer a estas células, reportan tener un efecto sobre las



mismas, ejemplos de ellas tenemos a Helja una lectina de tipo jacalina aislada de *Helianthus annuus*, la cual tiene propiedades anti-neuroblastoma (Pinedo *et al.*, 2017), la lectina de *Agrocybe aegerita* (AAL) que induce autofagia en células de carcinoma hepatocelular (Liu *et al.*, 2016), la frutalina muestra un efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer cervical (Oliveira *et al.*, 2011) y la concavalina A (Con A), se ha estudiado en cáncer de hígado (Lei & Chang, 2009).

Como se expone anteriormente, existe un gran número de lectinas aisladas de plantas, pero hasta la fecha existen solo dos lectinas aisladas de cactáceas, la primera es una lectina que fue obtenida por un grupo mexicano a partir de la especie *Machaerocereus eruca* a la que se denominó MeA (Zenteno *et al.*, 1988), de dicha lectina se demostró que era capaz de unirse a tejido obtenido de biopsias de cáncer de mama (Mayoral *et al.*, 2008), así como a tejido de biopsias de pacientes con diagnóstico de cáncer cervical (Solórzano *et al.*, 2012), detallándose que, tanto en cáncer de mama, como en el cervical, el reconocimiento de esta lectina se debía a la abundancia de proteínas O-glicosiladas en estos tejidos; la segunda lectina fue aislada de los cladodios de *Opuntia ficus-indica* a la cual se le denominó lectina de *Opuntia ficus-indica* (OfiL, Santana *et al.*, 2009) y que con trabajos posteriores se le demostró una actividad insecticida (Paiva *et al.*, 2011). Se sabe que México está reconocido como el principal centro de diversidad mundial de cactáceas con más de 1500 especies reportadas (Guzmán *et al.*, 2003), de ellas la especie más estudiada, quizás debido a su importancia comercial y alimenticia es *Opuntia ficus-indica*, de la cual se han reportado algunas de sus propiedades nutricionales (Hernández-Urbiola *et al.*, 2011) antioxidantes (Moran-Ramos *et al.*, 2012) y anti-inflamatorias (Madrigal-Santillán *et al.*, 2013) por tanto, la mayor parte de la planta es aprovechada; sin embargo, el pericarpio o cáscara de tuna de dicha especie, es considerado un desecho agroindustrial y si se pudiera obtener una molécula de interés, se le estaría dando un valor agregado. Es por ello que en el grupo de investigación a partir de 2012 se inició una búsqueda de proteínas tipo lectina en dicha especie, específicamente del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*. Se comenzó con la evaluación de actividad aglutinante en líneas celulares (SiHa, HeLa, C-33A y HaCaT) de fracciones proteicas obtenidas mediante saturación con sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,



Serrano, 2012). Posteriormente se probó la actividad citotóxica en cultivos de células de cáncer cervical (SiHa, HeLa, C-33A y HaCaT) y se exploró la metodología para tener una purificación parcial de una fracción proteica saturada al 40 % con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , la cual se corroboró que reconocía y aglutinaba de manera diferencial a las líneas tumorigénicas provenientes de cáncer cervical y que poseía especificidad para ácido siálico (SiA), un componente sacarídico abundante en estas líneas celulares (Patiño, 2013) y recientemente se evaluó actividad citotóxica de una fracción proteica con un porcentaje de saturación de 31-60 % con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , en líneas celulares de cáncer cervical (HeLa, C-33A y HaCaT) dando como resultado que esta fracción disminuye la viabilidad de líneas celulares provenientes de cáncer cervical (HeLa, C-33A), aunque no de manera específica ya que disminuyó la viabilidad de la línea control, HaCaT (Pileño-García & Tehuitzin-Acevedo, 2015), Estos resultados nos sugieren que en los extractos proteicos obtenidos del pericarpio de *O. ficus-indica* existe al menos una proteína de tipo lectina, y que las actividades: aglutinante y citotóxica pueden o no estar relacionadas a ella.



### Justificación.

Se sabe que existe un aumento en el patrón de glicosilación en la membrana celular de células carcinogénicas conforme va avanzando la enfermedad, proteínas como las lectinas que tienen la capacidad de reconocimiento específico a carbohidrato se están pensando como una herramienta en el área de diagnóstico y terapéutico de cáncer por los efectos de reconocimiento selectivo y citotóxico que algunas de las lectinas poseen, lo lleva a la búsqueda de nuevas proteínas de este tipo. Además, se ha observado que las plantas son la fuente más rica en lectinas. En las cactáceas es escaso el conocimiento de proteínas tipo lectina, a pesar de diversa variedad con la que cuenta nuestro país. *Opuntia ficus-indica* es la especie más estudiada de las cactáceas y de la cual se conocen varias propiedades (nutricionales, antioxidantes y anti-inflamatorias) aprovechando gran parte de la planta y dejando a un lado el pericarpio de tuna que es considerado un desecho agroindustrial. En la búsqueda de proteínas tipo lectina en cactáceas y el aprovechamiento de un desecho agroindustrial, el grupo de trabajo se ha dado a la tarea de identificar fracciones proteicas que contengan proteínas de tipo lectina del pericarpio de tuna, se cuenta con fracciones que muestran aglutinación diferencial en líneas celulares de cáncer cervical, con especificidad a SiA, así como ensayos preliminares de actividad citotóxica por parte de dicha fracción. Ambas actividades biológicas son características de proteínas de tipo lectina por lo que indica que puede existir en el pericarpio de tuna una proteína tipo lectina que posea ambas actividades, aunque no se descarta la posibilidad de que existan más proteínas y que estas actividades estén dadas por proteínas diferentes. Obtener datos que confirmen la presencia de proteínas tipo lectina que posean aglutinación y efecto citotóxico obtenidas del pericarpio de *Opuntia ficus-indica* abre la posibilidad de que en un futuro estas se puedan usar como una herramienta de diagnóstico y tratamiento para el cáncer, así como darle un valor agregado a una parte de la planta que se considera desecho.



## Objetivos

### General.

Identificar la presencia de proteínas tipo lectina del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*, en fracciones obtenidas a diferente concentración de sulfato de amonio que posean actividad aglutinante y citotóxica.

### Específicos

- Obtener fracciones proteicas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*.
- Determinar la actividad aglutinante de las fracciones proteicas obtenidas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*.
- Realizar ensayos de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer cervical de las fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*.
- Relacionar si la actividad aglutinante y citotóxica está dada por una proteína tipo lectina.



## **Material y métodos.**

### **Material biológico y reactivos.**

Las tunas de *Opuntia ficus-indica*, fueron adquiridas con un productor de la comunidad de San Sebastián Villanueva, Acatzingo, Puebla, se limpiaron de espinas y lavaron para quitar el polvo y demás residuos contaminantes. Los pericarpios de tuna fueron separados de la parte comestible y almacenados en refrigeración a -20 °C. La mayoría de los reactivos utilizados para el desarrollo de este trabajo fueron adquiridos como reactivos de alta pureza de la casa comercial Sigma-Aldrich.

### **Obtención de fracciones proteicas.**

Para la obtención de las fracciones proteicas se obtuvo en primera instancia el extracto total (ET), el cual se obtuvo mediante la molienda de 100 g de pericarpios durante 8 min con 100 mL de buffer fosfatos (PBS) pH 7.4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05 M,  $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$  0.05 M, NaOH 1 M). La mezcla homogénea se centrifugó a 10,000 rpm, durante 20 min a 4°C, para obtener el sobrenadante, mismo que fue filtrado en un embudo de vidrio cubierto con papel filtro y así retirar los restos vegetales. Una vez obtenido el ET se obtuvieron las primeras fracciones a trabajar 0-30 y 30-60 % (p/v) mediante precipitación salina o *salting out* con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de acuerdo a Wingfield (2016), a los cuales se les realizaron ensayos preliminares de actividad biológica tomando como referencia trabajos anteriores y fueron los que dieron pauta para determinar el método de fraccionamiento final para este trabajo, dichas fracciones finales fueron las obtenidas al 0-30, 30-60, y 80-100 % (p/v). Los precipitados proteicos de cada fracción, se mantuvieron en agitación durante 24 h a una temperatura de 4 °C y se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 20 min a 4°C para obtener la mayor cantidad posible de proteína saturada. Cada una de las fracciones obtenidas se resuspendió en un volumen de PBS que asegurase la no agregación de las proteínas (entre 4-8 mL). Para retirar el exceso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el cual puede interferir en otros experimentos, las fracciones colectadas fueron dializadas exhaustivamente con membranas de acetato de celulosa (Spectrapore®) tamaño de poro de ~10 KDa en PBS de acuerdo a Phillips & Signs (2004) terminada la diálisis se volvió a centrifugar a 10,000 rpm, 20 min y 4 °C, para descartar a las proteínas precipitadas y recuperar el sobrenadante.



### **Cuantificación de proteínas.**

Se empleó el método de Bradford adaptado para microplaca de 96 pozos (placas de ELISA), para la determinación de la concentración de cada una de las fracciones obtenidas (Bradford, 1976). Como solución blanco (absorbancia intrínseca del reactivo de Bradford) se utilizó 5  $\mu$ L de PBS más 100  $\mu$ L de reactivo de Bradford (Cat. B6916, Sigma-aldrich), se usó albúmina de suero fetal bovino (BSA, Cat. A2153, Sigma-aldrich) como estándar en una curva de calibración de 0.1-1.4 mg/mL. La lectura de la absorbancia se llevó a cabo a 600 nm y se calculó la concentración de la proteína utilizando los parámetros obtenidos a través de regresión lineal de los datos de la curva de calibración, la concentración fue expresada en mg/mL.

### **Electroforesis SDS-PAGE.**

Para identificar abundancia relativa y peso molecular de las proteínas de cada fracción se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes SDS como lo describe Laemmli (1970). La corrida se efectuó a 80 V por 20 min y 100 V por 1 h utilizando un marcador de peso molecular de 250-10 KDa (BIO-RAD, Cat. 1610363). El gel se colocó en la solución fijadora (40% etanol, 10% ácido acético, H<sub>2</sub>O) por 30 minutos y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie (0.25 g de Coomassie G-250, 100 ml ácido acético, 900 ml de H<sub>2</sub>O) por 30 min, finalmente se retiró el colorante con la solución desteñidora (40 metanol, 10% ácido acético, H<sub>2</sub>O) en agitación constante hasta revelar las bandas.

### **Ensayos de aglutinación.**

Los ensayos de aglutinación se realizaron en placas de ELISA de 96 pozos fondo redondo con eritrocitos humanos. Para lo cual la sangre fresca fue colectada en tubos de heparina mediante venopunción, los eritrocitos se separaron por centrifugación de la sangre y lavados con PBS (1500 rpm, 8 min a 4 °C) para realizar una suspensión al 3 % v/v de eritrocitos. Para el ensayo se agregaron en cada uno de los pozos 50  $\mu$ L de BSA al 1 % más 50  $\mu$ L de cada una de las muestras (realizando un triplicado por cada fracción evaluada), posteriormente se realizaron diluciones seriadas en el intervalo de 1:2 a 1:1024 tomando 50  $\mu$ L del primer pozo y pasándolo a los siguientes de manera seriada y finalmente se les agregó 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 3 %, se incubó a temperatura ambiente leyendo los resultados a las 2 h de



incubación. Como control positivo se usó 50  $\mu\text{L}$  de la aglutinina de germen de trigo (WGA por sus siglas en inglés) en una concentración de 1 mg/mL y como control negativo 100  $\mu\text{L}$  de BSA al 1 %. Los resultados se expresan como unidades de hemaglutinación (UHA), la cual se obtiene como el inverso de la última dilución en la que se observa aglutinación positiva y como actividad específica (AE), la cual se expresa en UHA/mg de proteína.

### **Ensayos de inhibición de la aglutinación con carbohidrato.**

Se identificó la especificidad de la aglutinación, probando diversos carbohidratos con los cuales se disponían (xilosa, Xyl; N-acetilglucosamina, GlcNAc; salicina, Sal; fucosa, Fuc; arabinosa, Ara; galactosa, Gal; glucosa, Glu; manosa, Man). El ensayo se llevó a cabo en placas de ELISA de 96, similar a los ensayos de aglutinación en donde se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de BSA al 1 % más 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras y se realizaron diluciones seriadas (experimentos realizados por triplicado). Una vez realizada la dilución se procedió a colocar cada uno de los carbohidratos a concentraciones de 250 y 400 mM, seguidos de 30 min de incubación de la placa a 37 °C. Terminado este tiempo se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de eritrocitos al 3 % a cada uno de los pozos para posteriormente dejar reposar la placa a temperatura ambiente por 2 h. Un resultado positivo de la inhibición de la aglutinación se determinó por la presencia de un botón de eritrocitos o células depositados al fondo de cada pozo de la placa. De manera similar a los ensayos de aglutinación se utilizó como control positivo 50  $\mu\text{L}$  la WGA en una concentración de 1 mg/mL y como control negativo 100  $\mu\text{L}$  de BSA al 1 %.

### **Ensayos de citotoxicidad.**

Las líneas celulares C-33A, HeLa (tumorigénicas) y HaCaT (no tumorigénica) fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cancerología. Cada línea celular fue sembrada en placas P60 con 4 mL de medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementadas con 10 % de suero fetal bovino y mantenidas en incubación a 37 °C hasta alcanzar una confluencia de 80 %, posterior los cultivos fueron preparados de la siguiente manera: se realizaron dos lavados con 2 mL de verseno a cada una de las líneas celulares, se desprendieron con una mezcla de 600  $\mu\text{L}$  de verseno, 200  $\mu\text{L}$  de tripsina, se centrifugaron a 1600 rpm por 3 min a temperatura ambiente para obtener el botón celular, el cual se



resuspendió en 1 mL de PBS 1X, para finalmente realizar la cuantificación celular con una cámara de Neubauer. Una vez cuantificadas, las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pozos (3,000 cels/pozo) con 50  $\mu$ L de medio DMEM más 10 % de suero fetal bovino y se dio tiempo a que se adhirieran a la placa, se les retiró el medio y se sustituyó por 50  $\mu$ L de medio basal para sincronizar los cultivos durante una noche. Se realizó un ensayo preliminar con la fracción del 30-60 % del primer proceso de saturación usando concentraciones 0, 10, 20, 40, 80 y 160  $\mu$ g agregando el medio basal necesario para completar un volumen final de 200  $\mu$ L por pozo. De las fracciones obtenidas con el proceso de saturación final y que reportaron actividad aglutinante positiva con eritrocitos humanos (ET y 80-100 %) se realizaron ensayos de citotoxicidad, considerando la fracción del 30-60 % de saturación para comparar los resultados con los primeros ensayos realizados con el primer fraccionamiento, para los cuales se colocó concentraciones de proteína de 0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ g agregando medio basal necesario para completar un volumen final de 200  $\mu$ L por pozo. Se utilizó WGA, cis-platino y curcumbina como control positivo, las placas se incubaron a 37 °C por 24 y 48 h (en el ensayo preliminar) y 24 h para el ensayo final, una vez terminado el tiempo de incubación se retiró el tratamiento y se agregó 10  $\mu$ L de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, Cat. M2003), se incubó nuevamente por 4 h a 37 °C para adicionar 100  $\mu$ L de isopropanol acidificado y hacer la lectura a 600 nm. La absorbancia obtenida es directamente proporcional al porcentaje de células viables.

### **Análisis de resultados.**

Los resultados promedio de cada uno de los ensayos en este trabajo fueron obtenidos de al menos tres experimentos independientes y sus valores son presentados con  $\pm$  desviación estándar, de estos mismos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) tomando como valor significativo  $P < 0.05$  y realizando una prueba post hoc (Tukey) para cada condición con el programa GraphPad Prism® versión 5.0.



## Resultados

### Fracción al 30-60 % de saturación

#### Ensayos de aglutinación

Como se mencionó en la sección de material y métodos, se llevó a cabo un primer protocolo de fraccionamiento por saturación salina, en donde se obtuvieron dos fracciones proteicas (0-30 y 30-60%) a las cuales les determinó su capacidad de aglutinación en líneas celulares tumorigénicas (HeLa y C-33A) y una línea celular no tumorigénica (HaCaT). Con los resultados obtenidos (tabla 1), en este ensayo no se observó aglutinación macroscópica (visible) para ninguna de las líneas celulares evaluadas; sin embargo, al realizar una observación microscópica se evidenció una aglutinación y esta fue diferencial entre las líneas tumorigénicas (HeLa y C-33A) respecto a la línea no tumorigénica (HaCaT) usada como control, corroborando así datos obtenidos por Patiño, 2013 (figura 1. Anexo 1).

**Tabla 1. Actividad aglutinante en fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica* en líneas celulares provenientes de cáncer cervical.**

Fracción proteica (%)	Línea celular		
	HaCaT	HeLa	C-33A
0-30	-	-	-
30-60	-	+	+

HaCaT: queratinocitos inmortalizados (línea celular no tumorigénica).

HeLa, C-33A (líneas celulares tumorigénicas de cáncer cervical).

-: Sin presencia de aglutinación

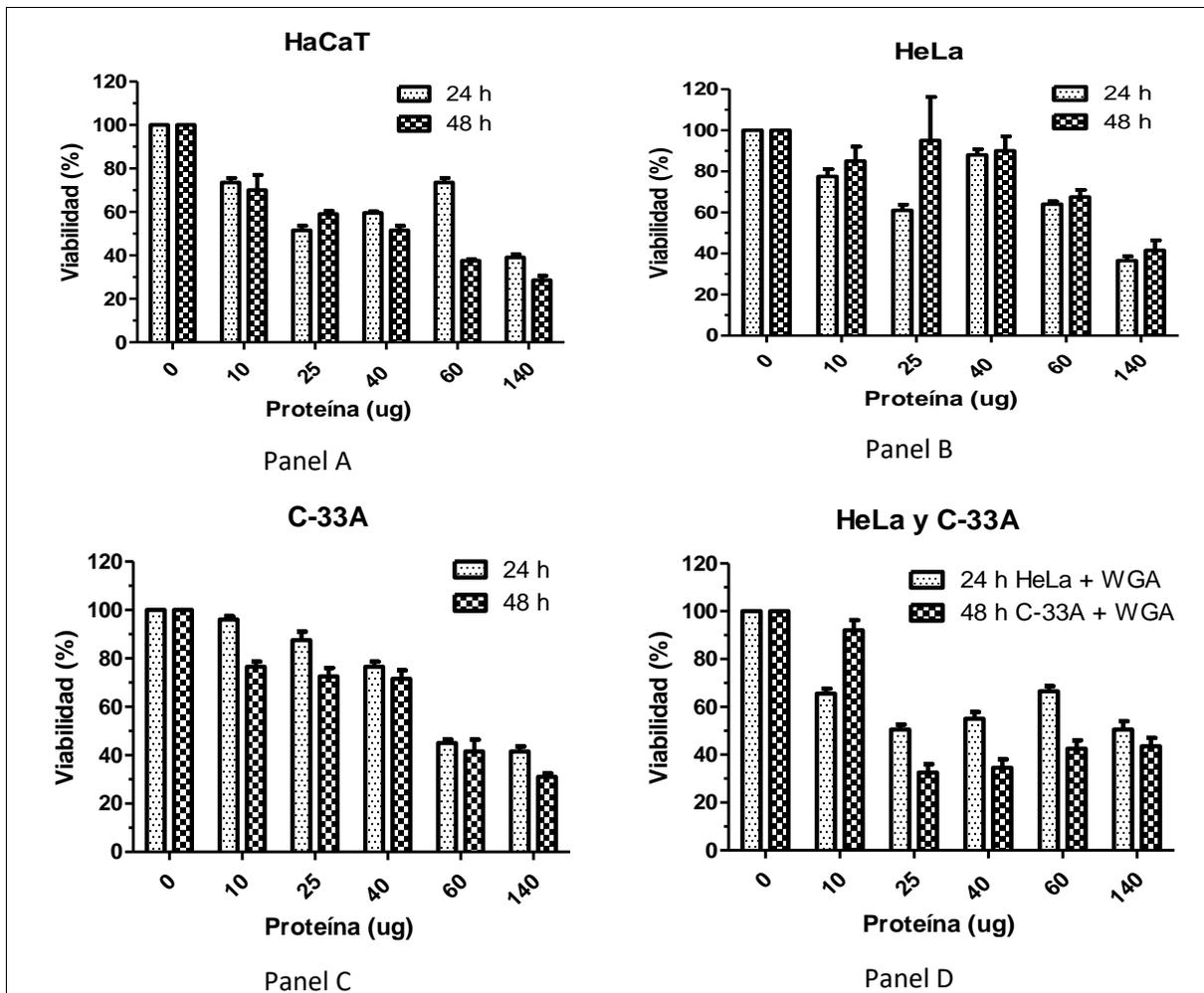
+: Aglutinación positiva

#### Ensayos de citotoxicidad

Otra propiedad frecuente en las lectinas que aglutinan, es la presencia de actividad citotóxica. Por ello, bajo el primer esquema de saturación (0-30 y 30-60 %), se evaluó dicho efecto, en donde se observó que existe una disminución evidente de la viabilidad celular en todas las líneas celulares evaluadas (incluyendo la línea celular HaCaT, figura 2). El panel A de la figura muestra los datos obtenidos con la línea celular HaCaT apreciándose una tendencia generalizada de disminución de la viabilidad conforme aumenta la concentración de la fracción proteica. Cabe destacar que el efecto sobre la viabilidad celular parece ser independiente del tiempo de incubación con la proteína, es decir, son necesarias 24 horas o menos para que la proteína cause un decremento notable en la viabilidad, siendo necesarios aproximadamente



34  $\mu\text{g}$  de la fracción proteica del 30-60 % con actividad aglutinante para disminuir al 50 % la viabilidad de los cultivos, en relación a la condición sin tratamiento (tomado como el 100% de viabilidad). Un efecto similar fue observado para las líneas celulares tumorigénicas HeLa y C-33A (Panel B y C) requiriéndose 50 y 75  $\mu\text{g}$  de la fracción proteica con actividad aglutinante para disminuir al 50 % la viabilidad de los cultivos con respecto a sus condiciones sin tratamiento. El efecto citotóxico que tiene esta mezcla de proteínas fue equiparable al efecto citotóxico de una lectina pura con alto grado de especificidad como lo es la WGA que requirió de 25 y 140  $\mu\text{g}$  de la fracción del 30-60 % para la reducción al 50% de viabilidad celular los cultivos celulares HeLa y C-33A respectivamente (panel D).



**Figura 2. Efecto citotóxico en cultivos celulares con la fracción del 30-60% y WGA a diferentes tiempos de incubación y concentraciones. Panel A.** Línea celular HaCat, 34  $\mu\text{g}$  de la fracción proteica causa una disminución del 50 % en la viabilidad. **Panel B.** Línea celular HeLa, se alcanza el 50% de viabilidad después de los 60  $\mu\text{g}$  de la fracción proteica. **Panel C.** El 50% de viabilidad en cultivos de la línea celular C-33A se alcanza cuando se colocan 50  $\mu\text{g}$  de la fracción proteica. **Panel D.** Líneas celulares HeLa y C-33A expuestas a WGA (Aglutinina de trigo). Los resultados se reportan en media  $\pm$  desviación estándar (DS) de tres repeticiones independientes.



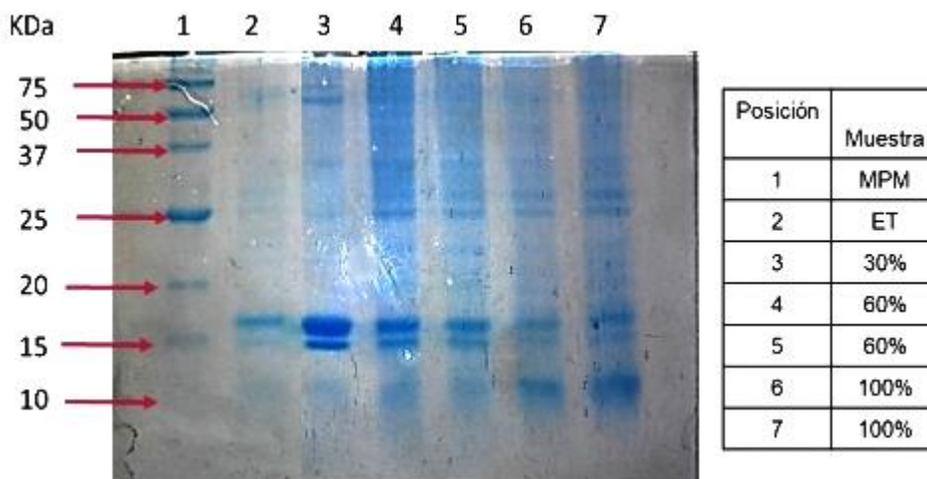
### Fracción del 80-100 % de saturación

#### Obtención de fracciones proteicas y cuantificación.

Los datos anteriores daban indicio de la presencia de una proteína tipo lectina en la fracción proteica de 30-60 % de saturación obtenidas del pericarpio de tuna *O. ficus-indica* por poseer actividad aglutinante y citotóxica. Optimizando las condiciones de precipitación salina para obtener una mejor separación de la fracción que presentó actividad biológica tipo lectina, se modificó el protocolo de saturación (velocidad de saturación) y con la cual se obtuvieron cuatro fracciones proteicas (ET, 0-30, 30-60, 80-100 % de saturación). Una vez realizada dicha separación se procedió a efectuar la cuantificación de proteína soluble de cada fracción, así como del extracto total (tabla 2). Las fracciones proteicas que presentaron mayor concentración corresponden a las obtenidas con 0-30 y 30-60 % de saturación, reportando para cada una de ellas concentraciones de  $1.5 \pm 0.6$  y  $1.7 \pm 0.7$  mg/mL de proteína soluble respectivamente y que adicionalmente en base al análisis estadístico realizado presentan una diferencia significativa con respecto al ET, la cual es la condición sin agente precipitante, y que reporta una concentración de  $0.4 \pm 0.2$  mg/mL de proteína, evidenciando así que el contenido proteico de cada una de las fracciones evaluadas es diferente dependiendo del grado de saturación.

Para identificar abundancia relativa y peso molecular de proteínas presentes en cada fracción se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes con SDS como lo describe Laemmili, (1970). Cada una de las fracciones presentó un patrón de bandeo distinto y como se observa en la figura 3, las bandas proteicas con un peso aproximado de 18 y 15 kDa fueron las únicas que se presentaron en todas las fracciones, aunque cabe destacar que conforme va aumentando el grado de saturación su abundancia relativa va disminuyendo, caso contrario sucede con las bandas con peso estimado de 28 y 25 kDa ya que tienden a aumentar su abundancia relativa y estas se presentan a partir de la fracción del 30-60 % de saturación, finalmente en la fracción del 80- 100 % de saturación, además de las bandas anteriores se logró obtener una banda con un peso aproximado de 12 kDa, siendo esta la más prominente. Los resultados de la cuantificación y del perfil proteico

corroboraron que el fraccionamiento ayuda a separar y concentrar distintos grupos proteicos presentes en el pericarpio de tuna de *O. ficus-indica*.



**Figura 3. Perfil proteico de las fracciones obtenidas del pericarpio de tuna *Opuntia ficus-indica*.** Electroforesis SDS-PAGE al 12 % de poliacrilamida, tinción con Azul de Coomassie. KDa: Kilodaltones, MPM: Marcador de peso molecular, ET: extracto total.

### Ensayos de aglutinación.

Se realizó el seguimiento de la actividad aglutinante para las fracciones proteicas obtenidas, realizando ensayos de aglutinación con eritrocitos humanos O<sup>+</sup> (Figura 4. Anexo 2). En dichos ensayos, se observó actividad aglutinante tanto con el ET como con la fracción proteica saturada de 80-100 % de saturación. Tomando en consideración las concentraciones de proteína de cada fracción y la última dilución en donde se registra aglutinación, se pudo determinar actividades específicas de 9.1 UHA/mg y 66.0 UHA/mg de proteína para las fracciones proteicas del ET y 80-100 % de saturación respectivamente (tabla 2).

**Tabla 2. Actividad aglutinante en fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica* en eritrocitos humanos O<sup>+</sup>.**

Fracción proteica (%)	Proteína soluble (mg/mL)	Agglutinación (Dilución positiva)	Unidades de hemaglutinación (UHA)	Actividad específica (UHA/mg)
ET	0.4 ± 0.2	1:2	4	9.1
0-30	1.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	-	-	0.0
30-60	1.7 ± 0.7 <sup>a</sup>	-	-	0.0
80-100	1.0 ± 0.3	1:32	64	66.0

Los resultados se reportan en media ± desviación estándar (DS) de cinco repeticiones independientes.

a: datos estadísticamente significativos de acuerdo a la prueba de Tukey (α=0.05).

ET: Extracto total

-: Sin presencia de aglutinación



### Ensayos de inhibición de la aglutinación.

Por definición, una proteína de tipo lectina se asocia a sus blancos moleculares a partir del reconocimiento específico de carbohidratos de la superficie celular. Así, la inhibición de la actividad aglutinante mediante el uso de una batería de carbohidratos, nos permite esclarecer si la proteína causante de la aglutinación celular es de tipo lectina y al mismo tiempo nos da un indicio de su especificidad de interacción. Para los ensayos de inhibición de los eritrocitos humanos efectuados con las fracciones que mostraron actividad hemaglutinante (ET y 80-100 % de saturación), se logró observar inhibición de la aglutinación en presencia de GlcNAc, GalN y Xyl, a concentraciones de 250 mM y 400 mM de carbohidrato para el ET y la fracción proteica del 80-100 % de saturación respectivamente (tabla 3 y figura 5. Anexo 3).

En conjunto los ensayos de aglutinación e inhibición de la aglutinación con eritrocitos humanos, indican que en la fracción del 80-100 % de saturación existe una proteína tipo lectina que presenta actividad aglutinante y que dicha actividad está dada por el reconocimiento a carbohidrato.

**Tabla 3. Inhibición de la aglutinación con carbohidratos de las fracciones obtenidas del pericarpio de tuna de *Opuntia ficus-indica*.**

Inhibición de la aglutinación en eritrocitos humanos (O <sup>+</sup> )				
Fracción proteica (%)	GlcNAc	GalN	Glc	Xyl
ET	+*	+*	-	+*
80-100	+**	+**	-	+**

ET= Extracto total, GlcNAc= N-acetilglucosamina, GalN= Galactosamina, Glc= Glucosa, Xyl= Xilosa. Se ocupó una batería de carbohidratos más amplia sin embargo se muestran los resultados más destacados.

+\*: inhibición de la aglutinación a 250 mM de carbohidrato.

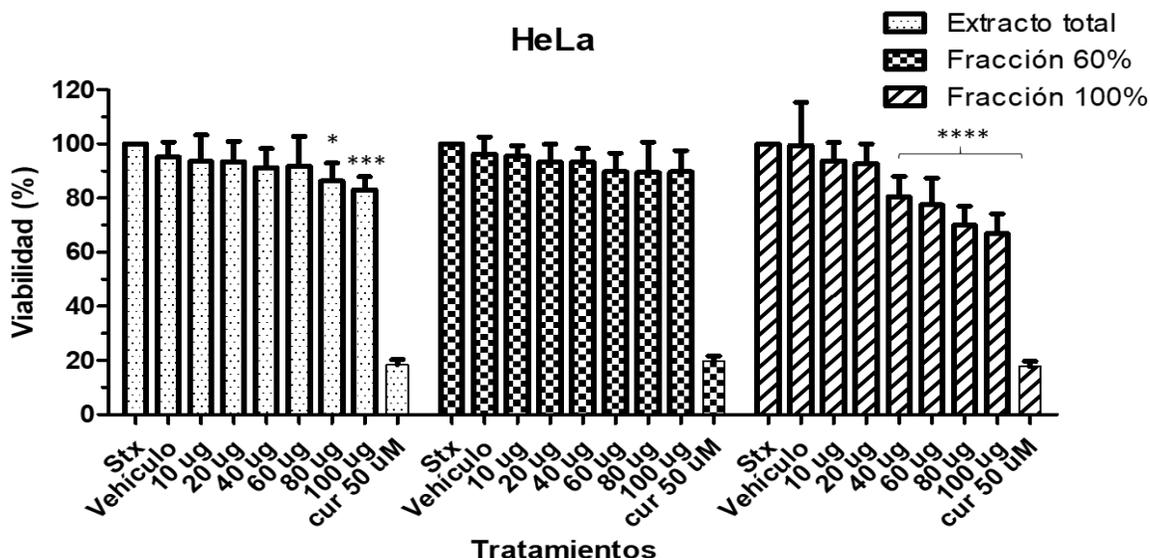
+\*\* : inhibición de la aglutinación a 400 mM de carbohidrato.

### Ensayos de citotoxicidad.

Se evaluó la capacidad citotóxica de las fracciones que presentaron aglutinación en eritrocitos humanos (ET y fracción del 80-100 % de saturación) con líneas celulares tumorigénicas (HeLa y C-33A), además de probar la fracción del 30-60 % de saturación para comparar resultados obtenidos en ensayos preliminares. En los resultados de manera general, se observó que el ET y la fracción del 80-100 % de saturación mostraron efecto citotóxico (figura 6 y 7), al igual que en la actividad aglutinante, el ET tuvo menor actividad. En la figura 6 se observa que el ET disminuye la viabilidad de manera significativa con respecto al control (condición sin



tratamiento) a partir de 80 µg de proteína para la línea celular HeLa y como se esperaba la fracción del 80-100 % de saturación requirió menor cantidad de proteína (40 µg) para presentar una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad reduciéndola hasta un 30 % en esta misma línea celular. Adicionalmente, el control positivo (curcumina) muestra una disminución del 80 % y con base al análisis estadístico es evidente la diferencia significativa que presenta respecto a la condición inicial (sin tratamiento).



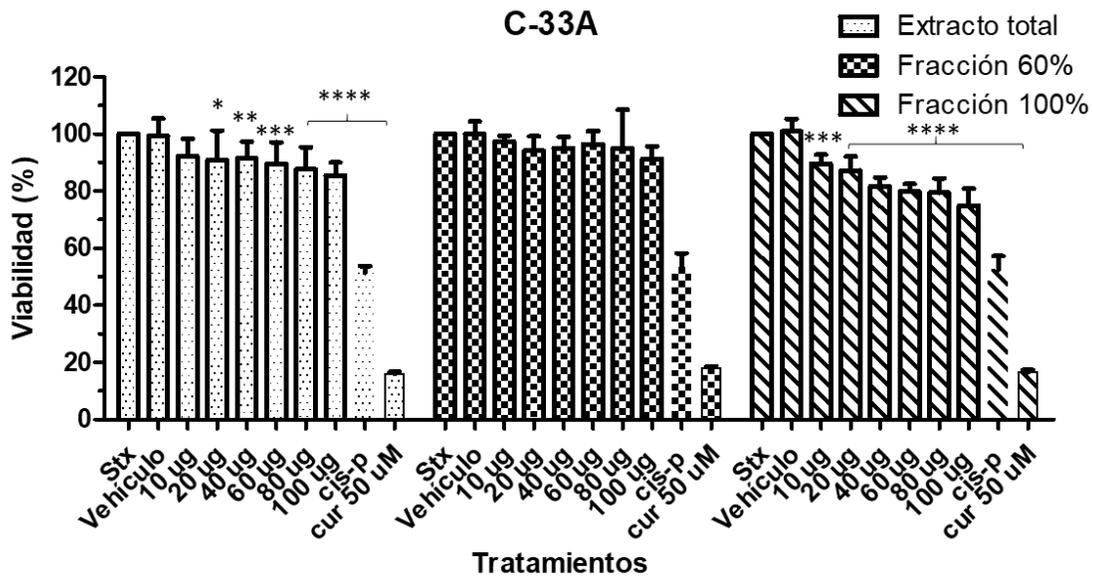
**Figura 6. Viabilidad de la línea celular HeLa incubada con diferentes fracciones.** El ET y la fracción del 80-100% muestran una disminución de la viabilidad de manera significativa, la fracción del 30-60 % presenta una ligera disminución, sin embargo, no es estadísticamente significativa. Resultados se reportados en media ± desviación estándar (DS), prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

- \*: Diferencia significativa baja
- \*\*\*: Diferencia significativa media
- \*\*\*\*: Diferencia significativa alta

Con respecto a la línea celular C-33A (figura 7) se evidencia un comportamiento similar en la disminución de la viabilidad necesitándose 20 µg del ET para tener una disminución estadísticamente significativa y 10 µg de la fracción proteica del 80-100 % de saturación, esta última disminuyó un 30 % la viabilidad de la línea celular, en ambos casos existe una diferencia estadística significativa con respecto a la condición sin tratamiento. En el caso de los controles positivos, esta línea celular alcanza una reducción de la viabilidad al 50 % con el cis-platino, mientras que con la curcumina se observa un decremento del 80 % de viabilidad.



Por último, la fracción del 30-60 % de saturación muestra un decremento de la viabilidad en ambas líneas celulares (figura 6 y 7), sin embargo, no es estadísticamente significativo, corroborando así que la proteína de interés presente en un principio en la fracción del 30-60 % de saturación (en el protocolo preliminar) se desplazó a la fracción proteica del 80-100 % de saturación. Estos resultados también evidencian el hecho de que las distintas líneas celulares, presentan diferente susceptibilidad al reconocimiento, aglutinación y efecto citotóxico por la proteína tipo lectina contenida en el ET y la fracción del 80-100 % de saturación.



**Figura 7. Viabilidad de la línea celular C-33A incubada con diferentes fracciones.** El ET y la fracción del 80-100 % de saturación muestran una disminución de la viabilidad de manera significativa y la fracción de 30-60 % de saturación posee actividad. Resultados se reportados en media  $\pm$  desviación estándar (DS), prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

\* y \*\*: Diferencia significativa baja  
 \*\*\*: Diferencia significativa media  
 \*\*\*\*: Diferencia significativa alta



## Discusión

La precipitación salina con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , se fundamenta en que las proteínas poseen diferentes contenidos de los grupos polares y apolares que les confiere la propiedad de solubilidad hasta una cierta concentración de sal y superando esta concentración, tienden a precipitar, proceso conocido como *salting-out* (Nelson & Cox, 2014). Dentro del protocolo de precipitación un paso crítico en el cual se tiene que tener especial cuidado es la velocidad de precipitación y la temperatura a la cual se realiza, puesto que al agregar la sal rápidamente (a pesar de mantener en agitación la solución) se puede sobresaturar solo una pequeña fracción de la misma. Con respecto a la temperatura, esta puede influir de manera que la saturación se lleve a cabo a diferentes densidades (Wingfield, 2016) y contribuir en consecuencia a precipitar proteínas en porcentajes diferentes, así como en la cantidad de precipitado proteico que se obtiene. Esto explicaría la diferencia de concentraciones entre cada una de las fracciones obtenidas y la actividad aglutinante que se reporta en las diferentes fracciones con las cuales se trabajó en estudios anteriores: fracción al 40 % (Patiño, 2013), fracción al 60 % (Pileño-García & Tehuitzin-Acevedo, 2015) que extrajeron del pericarpio de *Opuntia ficus-indica*, este dada por la misma proteína tipo lectina la cual se saturó en este trabajo del 80-100 %, debido a que los protocolos de saturación (velocidad) fueron diferentes.

La actividad aglutinante reportada con la fracción del 30-60 % de saturación (tabla 1) con líneas celulares provenientes de cáncer cervical muestra una concordancia con los antecedentes reportados anteriormente (Patiño, 2013, Pileño-García & Tehuitzin-Acevedo, 2015) ya que presenta una actividad aglutinante diferencial presentando aglutinación de líneas celulares tumorigénicas (HeLa, C-33A) y no la línea control (HaCat). Y al analizar los datos obtenidos con el protocolo final observamos que a pesar de que se obtiene una mayor concentración de proteína en las fracciones 0-30 y 30-60 % de saturación (tabla 2) esto no asegura que se obtenga actividad aglutinante, el cual es indicativo de la presencia de una proteína tipo lectina y como se demostró en estos ensayos, las fracciones que presentan una actividad aglutinante positiva son el ET y la fracción del 80-100 % de saturación con



(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, reportando una actividad específica de 9.1 y 66.0 UHA/mg de proteína respectivamente. Otro dato interesante es que el ET al ser una mezcla total de todas las proteínas extraídas de los pericarpios de tuna posea actividad aglutinante y que al aumentar el porcentaje de saturación se obtenga mejor actividad en la fracción del 80-100 % de saturación, esto es indicativo de que el proceso de saturación contribuyó a separar y concentrar una fracción proteica con actividad aglutinante, además de que la actividad reportada en la fracción del 30-60 % de saturación que se usó en un principio se vio desplazada a la fracción del 80-100 % de saturación.

Si son comparados la actividad aglutinante del ET obtenido de *Ricinus communis*, que reporta una actividad específica de 5.13 UHA/mg de proteína (Al-Mamun *et al.*, 2016) con el ET del trabajo se observa que el ET del pericarpio de tuna de *O. ficus-indica* posee una mejor actividad aglutinante, pero si se hace la comparación con el ET de *Haplomitrium mnioides* el cual presenta una actividad específica de 280 UHA/mg de proteína (Masuzaki, Hosono, & Nitta, 2017) el ET obtenido en este trabajo es notablemente inferior. Asimismo, la fracción del 80-100 % de saturación al ser una fracción proteica muestra mayor actividad comparada con algunas lectinas puras como la lectina obtenida de *Indigofera heterantha Sakeena* con la cual se reporta una actividad específica de 30.6 UHA/mg (Qadir *et al.*, 2013). Estudios más cercanos referente a lectinas de cactáceas se encuentra el reporte de Zenteno *et al.*, 1988 en el que el extracto total y una fracción del 66 % de saturación con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de MeA poseen una actividad específica de 247 y de 412 UHA/mg de proteína respectivamente y las dos isolectinas purificadas de dicha cactácea reportan una actividad específica de 2470 y 9326 UHA/mg de proteína, dichas actividades si son contrastadas con los resultados de esta investigación (ET y fracción del 80-100 % de saturación) extraídas del pericarpio de tuna de *O. ficus-indica* y como es evidente muestran una mejor actividad; por otra parte se encuentra el estudio de Santana *et al.*, 2009, en donde se logra aislar una lectina de los cladodios de *O. ficus-indica* y reporta una actividad específica de 40 UHA/mg de proteína, lo que indica que la fracción del 80-100 % de saturación posee mejor actividad que dicha lectina.



Las lectinas llevan a cabo el efecto de aglutinación debido a su capacidad de reconocimiento específico a carbohidrato, llevando a la formación de oligómeros con las células que los expresan en sus membranas celulares (Gabiús et al., 2011). Como se reporta en los resultados de la inhibición de la aglutinación (tabla 2) se comprobó que el efecto aglutinante está dado por reconocimiento a carbohidrato ya que dentro de los carbohidratos que reconoce tanto ET y la fracción del 80-100 % de saturación usando eritrocitos humanos se encuentra la GlcNAc, además Patiño, 2013 realizando ensayos de inhibición en líneas celulares de cáncer cervical usando una fracción saturada al 40 % reportó una especificidad para GlcNAc, GlcN y SiA (200 mM, figura 8. Anexo 4). Dichos carbohidratos poseen una similitud estructural (tabla 4. Anexo 5) y se ven implicados en procesos carcinogénicos puesto que se ha demostrado que la sialilación de los glicanos en la superficie de las células cancerosas va aumentando, contribuyendo a la agresividad, metástasis e invasión de un tumor (Pearce & Läubli, 2016).

Estos resultados junto con los ensayos de aglutinación confirman la presencia de una proteína tipo lectina contenida en la fracción del 80-100 % saturación del pericarpio de tuna *O. ficus-indica* por presentar una aglutinación positiva y que dicha aglutinación está dada por el reconocimiento a carbohidrato.

Explorando la actividad citotóxica, en una primera instancia, la fracción del 30-60 % de saturación que muestra actividad aglutinante diferencial y una marcada disminución de la viabilidad tanto en las líneas tumorigénicas como no tumorigénicas (figura 2), aunque en diferentes concentraciones. Esta diferencia en el requerimiento de proteína, indica que la sensibilidad al efecto citotóxico en presencia de la fracción proteica del 30-60 % de saturación, parece ser distintiva de cada línea celular, posiblemente por la cantidad de carbohidratos (glicanos) expresada en cada una de las membranas celulares (Varki et al., 2009). El efecto de la lectina pura WGA, (la cual, ha mostrado previamente su actividad citotóxica hacia líneas derivadas de cáncer cervical; Ohba & Bakalova, 2003) corroboró que son necesarias diferentes concentraciones de proteína para alcanzar un 50 % de citotoxicidad (140 µg para HeLa y 25 µg para C-33A.). Por comparación, aparentemente la fracción proteica del 30-60 % de saturación fue más efectiva al reducir en 50 % la viabilidad



en los cultivos con la línea celular HeLa, ya que solo se utilizaron 75  $\mu\text{g}$  de la fracción. Por el contrario, para los cultivos con la línea celular C-33A la fracción del 30-60 % de saturación fue menos eficiente puesto que utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de la fracción proteica contra 25  $\mu\text{g}$  necesarios de WGA pura.

Al evaluar el efecto citotóxico de las fracciones proteicas que presentaron aglutinación con eritrocitos de humanos (fracción ET y 100 %), se observa que tanto el ET y la fracción proteica del 80-100 % de saturación mostraron efecto citotóxico (figura 6 y 7) en las líneas celulares HeLa y C-33A incubadas a 24 h y esta disminución tiene significancia estadística. El hecho de observar que la fracción del 80-100 % de saturación tiene una mejor actividad citotóxica al igual que la aglutinación, corrobora una vez más que la velocidad de saturación, modifica la obtención de la proteína con actividad biológica de tipo lectina desplazándose a mayor concentración de agente desnaturalizante. Lo que explicaría que la fracción del 30-60 % de saturación mostrara una ligera disminución de la viabilidad, pero no una diferencia significativa. Si comparamos los datos obtenidos con la fracción del 80-100 % de saturación con otros estudios, como lo es el uso de las lectinas n-frutalina y r-frutalina provenientes de *Artocarpus incisa*, que requiere de 100  $\mu\text{g}$  de proteína para alcanzar un 50 % de disminución de la viabilidad en la línea celular HeLa (Oliveira *et al.*, 2011), se puede decir que al ser una mezcla de proteínas y no estar purificada completamente la fracción del 80-100 % de saturación induce un buen efecto citotóxico sobre líneas celulares estudiadas. Finalmente, a pesar de que aún no se tiene claro como las lectinas inducen la muerte celular, se ha propuesto que el mecanismo de inducción de la citotoxicidad puede ser a través de diferentes vías como: la inhibición de la síntesis de proteínas de novo, la activación de caspasas, la activación de la vía mitocondrial de ROS-p38-p53, así como a través de bloqueo de Ras-Raf y vías PI3K-Akt (Hostanska *et al.*, 2003; Lavastre *et al.*, 2002; Lei & Chang, 2009; Nunes *et al.*, 2012), lo cual implica que no hay una sola ruta de muerte celular activada por las lectinas o un mecanismo único de acción, sin embargo es necesaria llegar a la purificación para estudiar la vía por la cual la proteína de tipo lectina presente en *O. ficus-indica* ejerce su efecto citotóxico.



## Conclusiones

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que:

- El proceso de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  separó y concentró proteína de interés presente en el ET obtenido del pericarpio de tuna de *O. ficus-indica*, en la fracción del 80-100 % de saturación.
- La fracción al 80-100 % de saturación mostró actividad aglutinante en eritrocitos humanos (66.0 UHA/mg de proteína), así como hay evidencia de que la actividad aglutinante es diferencial en el caso de líneas celulares tumorigénicas respecto a las no tumorigénicas provenientes de cáncer cervical.
- La actividad aglutinante se ve inhibida con GlcNAc, GlcN y SiA, lo que indica que la fracción es específica para estos carbohidratos, los cuales son homólogos estructurales y que se ven alterados en procesos carcinogénicos.
- La fracción al 80-100 % de saturación mostró actividad citotóxica estadísticamente significativa para todas las líneas celulares evaluadas, aunque hasta el momento no se puede demostrar que este efecto sea diferencial como es el caso de la aglutinación.



## Referencias

- Al-Mamun, A. M., Akter, Z., Uddin, M. J., Ferdous, K. M. K. B., Hoque, K. M. F., Ferdousi, Z., & Abu Reza, M. (2016). Characterization and evaluation of antibacterial and antiproliferative activities of crude protein extracts isolated from the seed of *Ricinus communis* in Bangladesh. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(211), 1–10.
- Bajaj, M., Soni, G., & Singh, C. K. (2001). Interaction of pea (*Pisum sativum* L.) lectins with rhizobial strains. *Microbiological Research*, *156*(1), 71–74.
- Braford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. *72*:248–254.
- Cheng, X., Wu, Y., Guo, J., Du, B., Chen, R., Zhu, L., & He, G. (2013). A rice lectin receptor-like kinase that is involved in innate immune responses also contributes to seed germination. *The Plant Journal*, *76*, 687–698.
- De Hoff, P. L., Brill, L. M., & Hirsch, A. M. (2009). Plant lectins : the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics*, (282), 1–15.
- De Vasconcelos, M. A., Cunha, C. O., Arruda, F. V. S., Carneiro, V. A., Bastos, R. M., Mercante, F. M., ... Teixeira, E. H. (2013). Effect of leguminous lectins on the growth of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecules*, *18*(5), 5792–5803.
- Ferriz-Martinez, R. A., Torres-Arteaga, I. C., Blanco-Labra, A., & Garcia-Gasca, T. (2010). the Role of Plant Lectins in Cancer Treatment. *Nova Science Publishers, Inc.*, 71–89.
- Gabius, H.-J., Andre, S., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., & Solis, D. (2011). From lectin structure to functional glycomics : principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*(6), 298–313.
- Guzmán U, Arias S, Dávila P (2003) Catálogo de cactáceas mexicanas. Univ. Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 315
- Hernández-Urbiola, M. I., Pérez-Torrero, E., & Rodríguez-García, M. E. (2011). Chemical Analysis of Nutritional Content of Prickly Pads (*Opuntia ficus indica*) at Varied Ages in an Organic Harvest. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *8*(12), 1287–1295.
- Hostanska, K., Vuong, V., Rocha, S., Soengas, M. S., Glanzmann, C., Saller, R., ... Pruschy, M. (2003). Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *British Journal of Cancer*, *88*(11), 1785–92.
- Kaur, M., Singh, K., Rup, P. J., Kamboj, S. S., Saxena, A. K., Sharma, M., ... Singh, J. (2006). A Tuber Lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with Anti-insect and Anti-proliferative Properties. *Journal Biochemistry and Molecular Biology*, *39*(4), 432–440.
- Kodar, K., Izotova, J., Klaamas, K., Sergeyev, B., Järvekülg, L., & Kurtenkov, O. (2013). Aberrant glycosylation of the anti-Thomsen-Friedenreich glycotope immunoglobulin G in gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, *19*(23), 3573–82.
- Kurtenkov, O., & Klaamas, K. (2017). Hidden IgG Antibodies to the Tumor-Associated Thomsen-Friedenreich Antigen in Gastric Cancer Patients: Lectin Reactivity, Avidity, and Clinical Relevance. *BioMed Research International*, *2017*, 1–11.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of



- bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lam, S. K., & Ng, T. B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 45–55.
- Lavastre, V., Pelletier, M., Saller, R., Hostanska, K., & Girard, D. (2002). Mechanisms Involved in Spontaneous and *Viscum album* Agglutinin-I-Induced Human Neutrophil Apoptosis: *Viscum album* Agglutinin-I Accelerates the Loss of Antiapoptotic Mcl-1 Expression and the Degradation of Cytoskeletal Paxillin and Vimentin Proteins Via Ca. *J Immunol*, 168, 1419–1427.
- Lei, H.-Y., & Chang, C.-P. (2009). Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *Journal of Biomedical Science*, 16, 1–12.
- Li-Byarlay, H., Pittendrigh, B. R., & Murdock, L. L. (2016). Plant Defense Inhibitors Affect the Structures of Midgut Cells in *Drosophila melanogaster* and *Callosobruchus maculatus*. *International Journal of Insect science*, 8, 71–79.
- Liu, W., Yu, G., Yu, W., Ye, X., Jin, Y., Shrestha, A., ... Sun, H. (2016). Autophagy inhibits apoptosis induced by *Agrocybe aegerita* lectin in hepatocellular carcinoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(2), 221–229.
- López-Morales, D., Reyes-Leyva, J., Santos-López, G., Zenteno, E., & Vallejo-Ruiz, V. (2010). Increased expression of sialic acid in cervical biopsies with squamous intraepithelial lesions. *Diagnostic Pathology*, 5(1), 74.
- Macedo, M., Oliveira, C., & Oliveira, C. (2015). Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. *Molecules*, 20(2), 2014–2033.
- Madrigal-Santillán, E., García-Melo, F., Morales-González, J. a., Vázquez-Alvarado, P., Muñoz-Juárez, S., Zuñiga-Pérez, C., ... Hernández-Ceruelos, A. (2013). Antioxidant and anticlastogenic capacity of prickly pear juice. *Nutrients*, 5(10), 4145–4158.
- Masuzaki, H., Hosono, M., & Nitta, K. (2017). Purification of Two Novel Sugar Acid-binding Lectins from *Haplomitrium Mnioides* (bryophyte, Plantae) and their Preliminary Characterization. *Appl Biochem Biotechnol*, (181), 65–82.
- Mayoral M. A., Mayoral, C., Meneses, A., Villalvazo, L., Guzm, A. (2008). Identification of Galectin-3 and Mucin-type O-glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Invest.* 26: 615-623.
- Moran-Ramos, S., Avila-Nava, A., Tovar, A. R., Pedraza-Chaverri, J., Lopez-Romero, P., & Torres, N. (2012). *Opuntia ficus indica* (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. *Journal of Nutrition*, 142(11), 1956–1963.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2014). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (Sexta edic). OMEGA.
- Nunes, E. S., Souza, M. A. A., Vaz, A. F. M., Silva, T. G., Aguiar, J. S., Batista, A. M., ... Correia, M. T. S. (2012). Toxic Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon*, 59(7–8), 667–671.
- Ohba, H., Bakalova, R. (2003). Relationships between the degree of binding, cytotoxicity and cytoagglutinating activity of plant-derived agglutinins in normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines. *Cancer Chemo and Pharm.* 51: 451-458.
- Oliveira, C., Teixeira, J. A., Domingues, L., & Nicolau, A. (2011). Cytotoxic Effects of Native and Recombinant *Frutalin*, a Plant Galactose-Binding Lectin, on HeLa Cervical Cancer Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Paiva, P. M. G., Santana, G. M. S., Souza, I. F. A. C., Albuquerque, L. P., Agra-Neto, A. C.,



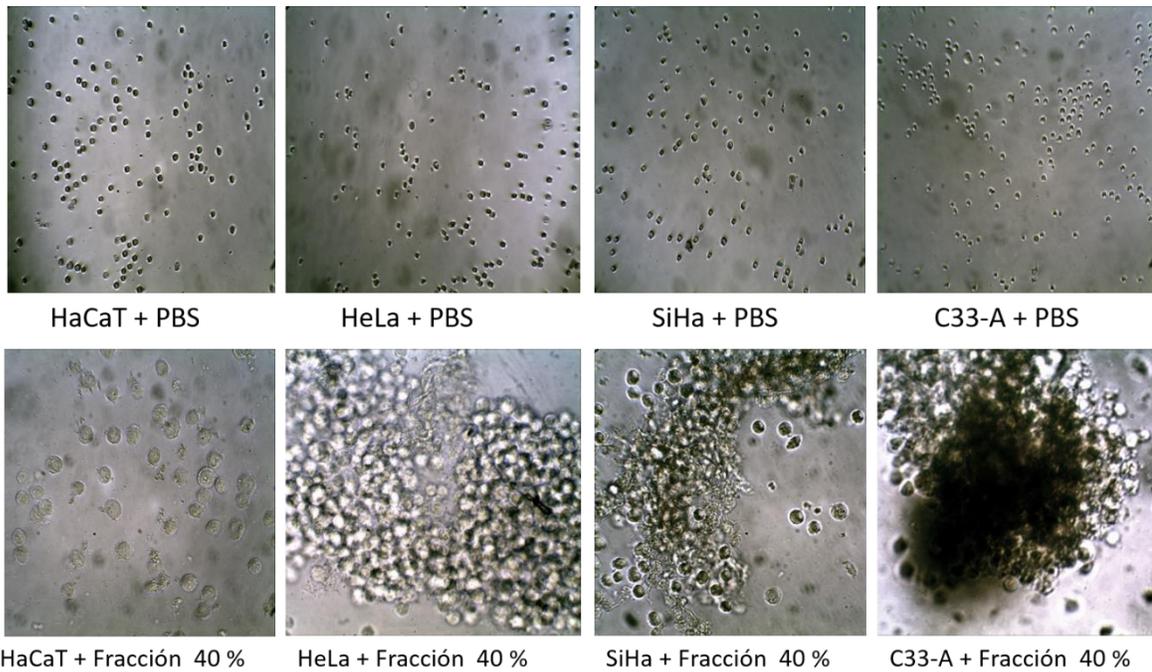
- Albuquerque, A. C., ... Coelho, L. C. B. B. (2011). Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 982–989.
- Patiño, C. (2013). Reconocimiento y aglutinación diferencial de células de cáncer cervical mediante el uso de una lectina obtenida de la cáscara de tuna. Tesis de maestría. Chilpancingo de los Bravo, México: Universidad Autónoma de Guerrero. No publicado.
- Pearce, O. M. T., & Läubli, H. (2016). Sialic acids in cancer biology and immunity. *Gly*, 26(2), 111–128.
- Petrosian, K., Banner, L. R., & Oppenheimer, S. B. (2007). Lectin binding and effects in culture on human cancer and non- cancer cell lines: Examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta Histochem*, 109(6), 491–500.
- Peumans, W. J., & Damme, E. I. S. J. M. Van. (1995). Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant Physiol.*, 109, 347–352.
- Phillips, A. T., & Signs, M. W. (2004). Exchange by Dialysis and Ultrafiltration. *Current Protocols in Protein Science*, 4.4.1-4.4.15.
- Pileño-García, J. & Tehuitzin-Acevedo, L. (2014). Viabilidad en líneas celulares provenientes de cáncer cervical mediante el uso de una fracción proteica obtenida de la cáscara de tuna. Tesis de licenciatura. Chilpancingo de los Bravo, México: Universidad Autónoma de Guerrero. No publicado.
- Pinedo, M., Genoula, M., Silveyra, M., De Oliveira Carvalho, A., Regente, M., Del Río, M., ... De La Canal, L. (2017). Anti-Neuroblastoma Properties of a Recombinant Sunflower Lectin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 92.
- Qadir, S., Wani, I. H., Rafiq, S., Ganie, S. A., Masood, A., & Hamid, R. (2013). Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, 999–1006.
- Santaella-Verdejo, A., Gallegos, B., Pérez-Campos, E., Hernández, P., & Zenteno, E. (2007). Use of *Amaranthus leucocarpus* Lectin to Differentiate Cervical Dysplasia (CIN). *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 37, 219–228.
- Santana, G. M. S., Albuquerque, L. P., Simões, D. A., Coelho, L. C. B. B., Paiva, P. M. G., & Gusmão, N. B. (2009). Isolation of Lectin from *Opuntia ficus-indica* Cladodes G.M.S. *Acta Horticulturae*, (811), 281–286.
- Serrano, A. L. (2012). Identificación de fracciones proteicas de cáscara de tuna con actividad aglutinante hacia células de cáncer cervical. Tesis de licenciatura. Chilpancingo de los Bravo, México: Universidad Autónoma de Guerrero. No publicado.
- Serrano, M. A., López, J. L., & Serrano, J. R. (2012). Expresión de ácidos siálicos en el cáncer cervicouterino. Estudio de una población del Hospital Regional Lic. Adolfo López Mateos. *Rev Esp Méd Quir*, 17(2), 115–118.
- Serrato, J. A., Lascurain, R., García-herrera, D., & Rosete, P. G. (2011). Determinación del perfil de glicosilación de los glicoconjugados de membrana de la línea celular A427 de adenocarcinoma pulmonar humano mediante el uso de lectinas, 70(4), 236–242.
- Solórzano, C., Mayoral, M. Á., Carlos, M. D. L. A., Berumen, J., Guevara, J., Chávez, F. R., ... Zenteno, E. (2012). Overexpression of glycosylated proteins in cervical cancer recognized by the *Machaerocereus eruca* agglutinin. *Folia Histochem Cytobiol*, 50(3), 398–406.
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., ... Etzler, M. E.



- (2009). *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wingfield, P. (2016). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. In P. T. Wingfield (Ed.), *Current Protocols in Protein Science* (Vol. 84, p. A.3F.1-A.3F.9). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Xiao, J., Li, C., Xu, S., Xing, L., Xu, Y., & Chong, K. (2015). JACALIN-LECTIN LIKE1 Regulates the Nuclear Accumulation of GLYCINE-RICH RNA-BINDING PROTEIN7, Influencing the RNA Processing of FLOWERING LOCUS C Antisense Transcripts and Flowering Time in *Arabidopsis 1*[OPEN]. *Plant Physiol.*, *169*, 2102–2117.
- Zenteno, E., Debray, H., & Montreuil, J. (1988). Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereus eruca*. *FEBS Letters*, *238*(1), 95–100.

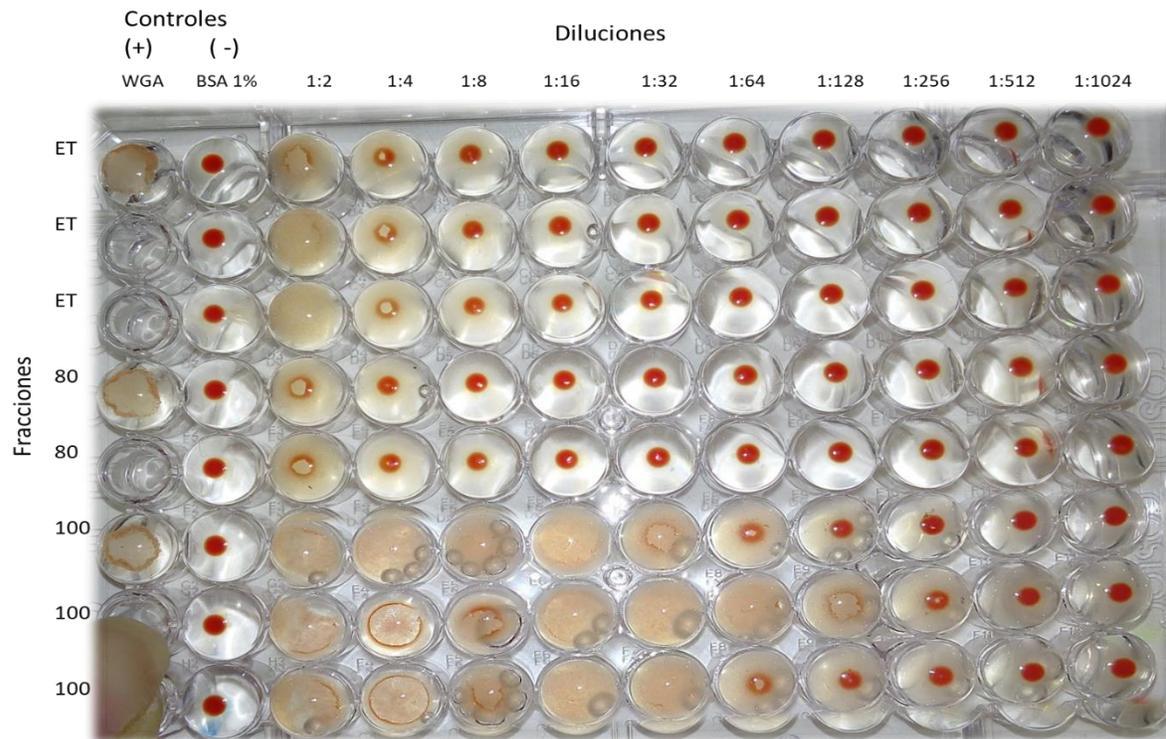
## Anexos

### Anexo 1. Ensayo de aglutinación con líneas celulares



**Figura 1. Ensayo de aglutinación con líneas celulares.** En la parte superior se muestran los controles negativos (sin proteína) con cada una de las líneas celulares. En la parte inferior, se muestra la actividad aglutinante de la fracción de 40 % que mostró una mejor actividad aglutinante. Todas las líneas tumorogénicas (HeLa, SiHa, C-33A) son reconocidas y aglutinadas, mientras que la línea celular control (HaCat) no fue aglutinada (Patiño, 2013).

## Anexo 2. Ensayo de aglutinación con eritrocitos humanos O<sup>+</sup>



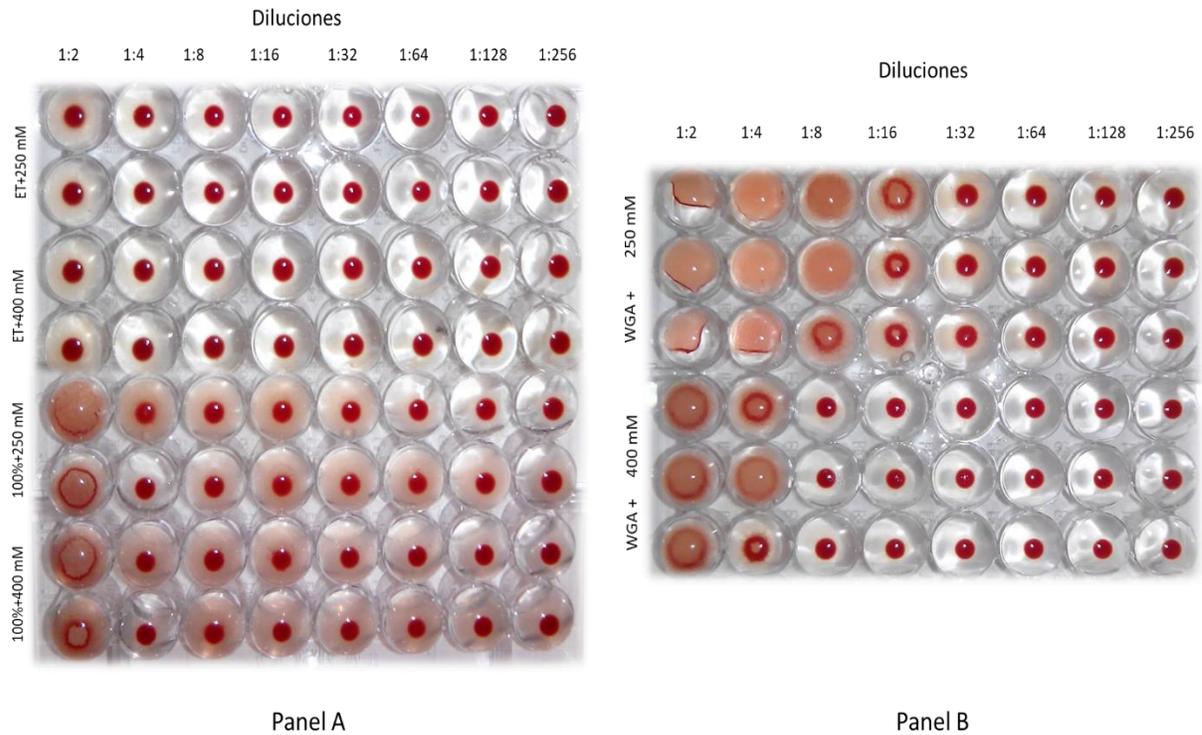
**Figura 4. Ensayo de aglutinación con eritrocitos humanos.** Se muestra una actividad aglutinante positiva del ET en una dilución 1:2, lo cual representa una actividad específica del 9.1 UHA/mg de proteína, la fracción del 80-100 % de saturación presenta actividad aglutinante en una dilución 1:32, lo que se traduce en una actividad específica del 66.0 UHA/mg de proteína.

ET: Extracto total.

WGA: Aglutinina de germen de trigo (control positivo).

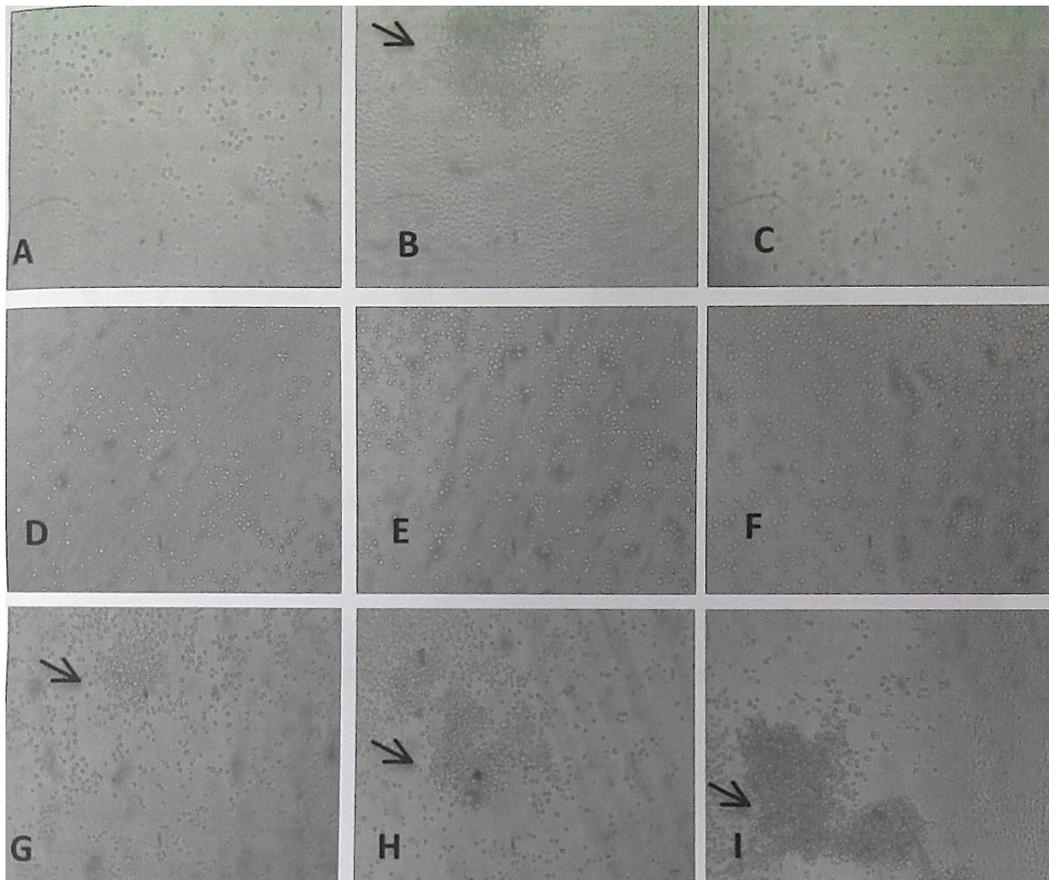
BSA: Albumina de suero fetal bovino (control negativo).

### Anexo 3. Ensayo de inhibición con carbohidrato en eritrocitos humanos O<sup>+</sup>



**Figura 7. Ensayo de Inhibición de la aglutinación con GlcNAc en eritrocitos humanos O<sup>+</sup>.** Concentraciones 250 y 450 mM de GlcNAc. **Panel A.** Se muestra la inhibición de la aglutinación con GlcNAc en el ET a partir de una concentración de 250 mM de carbohidrato, mientras que para la fracción proteica del 80-100 % de saturación se comienza a ver una inhibición a los 400 mM. **Panel B.** Se usó la WGA (aglutinina de germen de trigo) como control positivo con bajo las mismas concentraciones de carbohidrato (250 y 400 mM).

#### Anexo 4. Ensayo de inhibición con líneas celulares



**Figura 8. Ensayo de inhibición de la aglutinación en la línea celular C-33A.** Concentraciones de 200 mM de GlcNAc, Glc, SiA, Sac, Lac y Xyl, observación llevada a cabo a 10 X **A.** Control (PBS y células) **B.** Control negativo (fracción proteica al 40 % y células) **C.** Control positivo (WGA, GlcNAc y células) **D.** GlcNAc, inhibición positiva **E.** GlcN, inhibición positiva **F.** SiA, inhibición positiva **G.** Sac, inhibición negativa **H.** Lac, inhibición negativa **I.** Xyl, aglutinación negativa (Patiño, 2012)..



**Anexo 5. Estructuras de los carbohidratos reconocidos**

Carbohidrato	Estructura
GlcN	
GlcNAc	
SiA	
Xyl	

**Tabla 4. Estructuras de los carbohidratos reconocidos por las fracciones proteicas.** Se puede apreciar que la GlcN, GlcNAc y el SiA comparten la misma base estructural cambiando solo algunos radicales que poseen y la Xyl es un carbohidrato implicado en la producción de O-glicanos.