

Purificación y caracterización biológica parcial de una Lectina de Frijol Vaquita

Mancera-Castro P.¹, González-Cruz L.^{1,2}, Valadez-Vega C.³, Hernández-López D.², Ramírez-Medina H.^{1,2}, Juárez-Goiz M.², Bernardino-Nicanor A.^{1,2*}

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Celaya, Posgrado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Celaya, Guanajuato.

²Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica.

³Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud. Pachuca de Soto, Hidalgo.

*aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx

Resumen

Las lectinas son proteínas que no son producto de la respuesta inmune, tienen la capacidad de aglutinar células y precipitar glicoconjugados, ya que actúan como moléculas de reconocimiento dentro de las células y en las superficies celulares, llamando la atención dentro del área biomédica, ya que presentan propiedades biológicas, principalmente capacidad anticancerígena. El objetivo del presente estudio fue purificar y caracterizar parcialmente la lectina de frijol vaquita (*Vigna unguiculata*), así como evaluar su actividad antioxidante, para lo cual, se utilizó frijol vaquita proveniente del estado de Hidalgo, la lectina se aisló por cromatografía de afinidad, utilizando fetuina como matriz, la lectina se obtuvo en las fracciones 54 a la 68, la cual mostró actividad hemaglutinante sobre eritrocitos humanos tipo A y O (11 906.98 unidades de hemaglutinación/mg proteína, en ambos casos); además, el grado de purificación aumentó 69.30 veces comparado con el extracto crudo. La lectina mostró inhibición del radical ABTS (pH básico) (236.94 $\mu\text{mol Trolox/g}$), sin embargo, frente al radical FRAP no presentó actividad, debido a las condiciones ácidas del medio. Este estudio representa la base para una posterior caracterización bioquímica y biológica de la lectina y su posible aplicación en el área médica.

Palabras clave: *Vigna unguiculata*, actividad antioxidante, actividad hemaglutinante.

Abstract

Lectins are proteins that are not a product of the immune response, they have the ability to agglutinate cells and precipitate glycoconjugates, since they act as recognition molecules within cells and on cell surfaces, drawing attention within the biomedical area, since they have biological properties, mainly anticancer capacity. The objective of the present study was to partially purify the cowpea lectin (*Vigna unguiculata*) and to evaluate its antioxidant and hemagglutinating activity, to this purpose cowpea seed from the state of Hidalgo were used, the lectin was isolated by affinity chromatography, using fetuin as matrix, obtaining the lectin in the fractions comprised in the range of 54-68, which showed hemagglutination (specific activity) on the human erythrocytes type A and O (11 906.98 hemagglutinating units/mg of protein, in both cases); furthermore, the degree of purification increased 69.30 fold compared to the crude extract. Lectin showed inhibition of the ABTS radical (basic pH) (236.94 $\mu\text{mol Trolox/g}$), however, against the FRAP radical it did not show activity, due to the acidic conditions of the medium. This study represents the basis for a subsequent biochemical and biological characterization of lectin and its possible application in the medical area.

Keywords: *Vigna unguiculata*, antioxidant activity, hemagglutinating activity.

Área: Cereales, leguminosas y oleaginosas

INTRODUCCIÓN

Las lectinas (del latín, *legere*, seleccionar o elegir) son proteínas, las cuales no son producto de una respuesta inmune, muestran especificidad al unirse a carbohidratos y glicoproteínas (Sharon y Lis, 2013), teniendo la capacidad de aglutinar células (eritrocitos, linfocitos, células malignas, etc.) y precipitar glicoconjugados (glicoproteínas, glucolípidos) (Mishra *et al.*, 2019), ya que actúan como moléculas de reconocimiento dentro de las células y en las superficies celulares (Sharon y Lis, 2013). Los principales estudios y aplicaciones que se han llevado a cabo con lectinas son en cáncer, al evaluar su actividad antitumoral y antimetástica en diferentes líneas celulares (Valadez-Vega *et al.*, 2014), la activación de linfocitos (células inmunitarias) (Castillo-Villanueva *et al.*, 2007), su actividad antifúngica, antidiabética, antiviral, antimicrobiana y antiparasitaria (Mishra *et al.*, 2019); pero en la actualidad, su estudio va en aumento, buscando otras posibles actividades biológicas, como la actividad antioxidante y antihipertensiva.

Las lectinas pueden ser obtenidas a partir de fuentes microbianas, animales y vegetales, estas últimas son las más estudiadas, principalmente aquellas provenientes de la familia de las leguminosas; donde se ha demostrado que juegan un papel importante en la defensa de la planta contra depredadores y patógenos, así como en la simbiosis con bacterias fijadoras de Nitrógeno (Ribeiro *et al.*, 2018). Se han estudiado cerca de 100 miembros de esta familia distribuidos en 70 géneros (Sharon y Lis, 2013). Dentro de ellas destaca el género *Vigna*, que ha sido poco estudiado, a pesar de estar comprendido por más de 100 especies, sin embargo, solo nueve o diez han sido domesticadas, una de las cuales es el frijol vaquita (*Vigna unguiculata*), el cual, es originario de África, pero su cultivo se ha extendido en América (Harouna *et al.*, 2018); en México se cultiva en algunos estados de las zonas sureste, centro, noreste y occidente, siendo una fuente importante de alimento para la población rural de dichos estados (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha evidenciado la presencia de componentes bioactivos en el frijol vaquita, entre los que destacan las lectinas, sin embargo, estas moléculas aún no han sido caracterizadas por completo, sobre todo su posible actividad biológica. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue purificar parcialmente la lectina de frijol vaquita (*Vigna unguiculata*) y evaluar su actividad biológica (actividad hemaglutinante y antioxidante *in vitro*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. El frijol vaquita (*Vigna unguiculata*) fue proveniente de Tulancingo, municipio del Estado de Hidalgo, las semillas se seleccionaron y molieron hasta pasar por una malla No. 40 (partícula ≤ 0.425 mm). La harina se almacenó en frascos de vidrio a temperatura ambiente hasta su análisis.

Extracción y purificación de la lectina

Extracto crudo. Se siguió la metodología propuesta por González de Mejía *et al.* (1990). Se preparó una dispersión de harina en buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS) en una relación 1:10 p/v, la cual se mantuvo en agitación constante (250 rpm) por 16 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó (10000 rpm, 1 hora, 4°C), recuperando el sobrenadante (extracto crudo).

Extracto proteínico. La proteína del extracto crudo se precipitó con sulfato de amonio al 70% de saturación con agitación constante (250 rpm) durante 1 hora a 4°C. Se centrifugó (10000 rpm, 1 hora, 4°C), y el pellet (extracto proteínico) se resuspendió en 10 mL de PBS y se dializó en una membrana de diálisis (MWCO 25 kDa) contra PBS con tres cambios durante 24 horas. El extracto se mantuvo en congelación a -20°C hasta su análisis (Valadez-Vega *et al.*, 2014).

Purificación parcial de la lectina. La purificación se llevó a cabo con el protocolo descrito por Valadez-Vega *et al.*, (2014), mediante cromatografía de afinidad (matriz fetuína-agarosa). Se utilizó PBS como buffer de elución de proteínas no retenidas y buffer glicina-HCl pH 2.8 para eluir las lectinas de la matriz; a un flujo de 3 mL/min y colectando fracciones de 3 mL. La absorbancia se monitoreó a 280 nm. Posteriormente, las fracciones de lectina se dializaron en una membrana de diálisis (MWCO 25 kDa) contra agua destilada con tres cambios durante 24 horas. Se liofilizó y se mantuvo en congelación a -20°C.

Actividad hemaglutinante

Título de hemaglutinación (UH). Se determinó mediante la técnica de dilución en serie (Sharma *et al.*, 2009), usando eritrocitos humanos A y O al 2% p/v en PBS en microplacas de fondo plano a temperatura ambiente. UH se define como el recíproco de la dilución más alta que exhibe aglutinación de eritrocitos (Thompson *et al.*, 1986).

Actividad específica. Se calculó dividiendo el título de hemaglutinación entre los miligramos de proteína soluble (Bradford, 1976), con albumina de suero bovino (BSA) como estándar, presentes en 50 µL de muestra, y se expresó como unidades de hemaglutinación (U)/mg proteína.

Actividad antioxidante

Se determinó por dos métodos colorimétricos/espectrofotométricos: el poder reductor/antioxidante del hierro (FRAP) (pH 3.6) a 593 nm indicado por Benzie y Strain, (1996); y utilizando el radical ABTS^{*+} (pH 7.4) a 734 nm propuesto por Re *et al.* (1999). Los resultados se expresaron como µmol Trolox/g de muestra en base seca.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (n=3). En la actividad antioxidante se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con 95% de confiabilidad y $p < 0.05$, seguido por una prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples, con el paquete estadístico GraphPad Prism 8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Purificación de la lectina y actividad hemaglutinante

El cromatograma obtenido para la purificación de la lectina de frijol vaquita se muestra en la **Figura 1**, donde se observa un comportamiento semejante a los reportados para la separación de otras lectinas, utilizando el mismo método cromatográfico y misma matriz (fetuína), pero para otras leguminosas, como es el frijol tépari (*Phaseolus acutifolius*) (Valadez-Vega *et al.*, 2011; Castillo-Villanueva *et al.*, 2007).

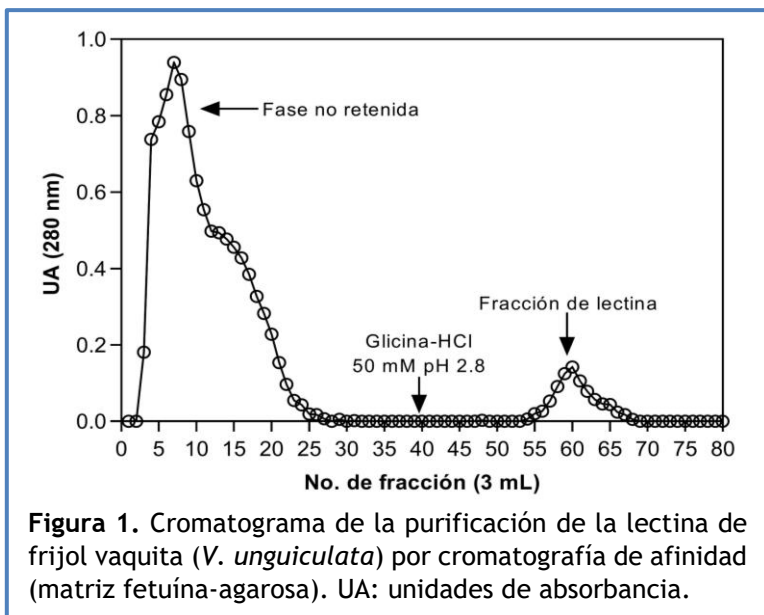


Figura 1. Cromatograma de la purificación de la lectina de frijol vaquita (*V. unguiculata*) por cromatografía de afinidad (matriz fetuína-agarosa). UA: unidades de absorbancia.

Por otra parte, He *et al.* (2018) demostraron que las etapas de purificación de lectinas deben iniciar con la precipitación de las proteínas con salting out (sulfato de amonio), para después separar por cromatografía de intercambio iónico o de afinidad.

En las fracciones de 54 a la 68 se observa la presencia de la lectina del frijol vaquita, lo cual se corroboró al determinar su actividad hemaglutinante sobre eritrocitos humanos tipo A y O.

En la **Tabla I** se presenta la actividad hemaglutinante de las etapas de purificación de la

lectina. Los resultados mostraron que cada paso de purificación incrementa la actividad hemaglutinante, lo que se considera una parte importante de la estrategia de purificación de la lectina (He *et al.*, 2018).

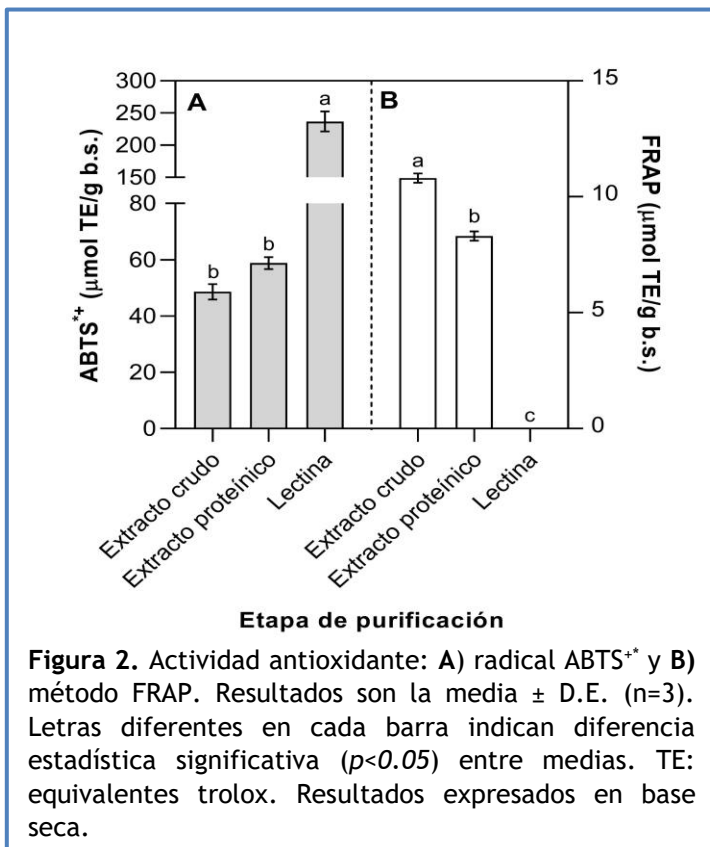
Por otro lado, se observa que no existe especificidad de las lectinas con respecto al tipo de sangre, lo que da un indicio de que el carbohidrato o glicoproteína al cual presenta especificidad de unirse se encuentra en la superficie de los eritrocitos, según lo indicado por Lis y Sharon, (1986).

Etapas de purificación ^b	Proteína ^a	UH ¹	AE ²	UH ¹	AE ²	Grado de purificación
	mg	eritrocitos tipo "A"		eritrocitos tipo "O"		
Extracto crudo	968.51	128	171.81	256	343.62	1
Extracto proteínico	89.95	4 096	4 553.64	4 096	4 553.64	26.50
Lectina	4.3	512	11 906.98	512	11 906.98	69.30

UH: título de hemaglutinación; AE: actividad específica. ¹ Representa el recíproco de la dilución más alta que presenta hemaglutinación. ² Unidades de hemaglutinación (UH)/mg proteína soluble. ^a proteína soluble. ^b Resultados para 10 gramos de harina.

Actividad antioxidante

En la actualidad, hay muy pocos reportes que evalúen la actividad antioxidante de lectinas, por lo que su mecanismo de acción aún es desconocido, así como los radicales libres en los cuales pudiera presentar actividad.



La actividad antioxidante de las lectinas obtenidas a partir del frijol vaquita (**Figura 2**), determinada por el método del radical ABTS⁺, presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) incrementando de manera directa al aumentar el grado de purificación, sin embargo, con el método FRAP, la lectina no mostró actividad y el extracto crudo y proteínico presentaron una actividad antioxidante muy similar.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían ser explicados por las condiciones de operación en las cuales se llevan a cabo las reacciones de oxidación de los radicales. El método de FRAP maneja condiciones ácidas (pH 3.6) y según lo indicado por Jiang *et al.* (2019) y Voet y Voet, 2004, a pH's muy ácidos o alcalinos, los H⁺ y OH⁻ afectan el estado de ionización de una proteína alterando las interacciones

electroestáticas que estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria, provocando desnaturalización y por ende pérdida de la actividad biológica; comparado con el radical ABTS, en el cual, la reacción de oxidación se lleva en un pH casi neutro (7.4), por lo cual, la lectina no pierde actividad biológica al no sufrir cambios en su conformación (estructura terciaria y cuaternaria).

CONCLUSIONES

Las lectinas de frijol vaquita no presentan especificidad hacia algún tipo de eritrocito (A y O). La actividad hemaglutinante se incrementa directamente con el grado de purificación. La actividad antioxidante con un radical en condiciones básicas con un pH de 7.4 se incrementa con el grado de purificación, sin embargo, en condiciones ácidas (pH 3.6) no presenta actividad.

Financiación y agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Tecnológico Nacional de México (clave: 7757.20-P). P. Mancera-Castro agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios de Maestría (No. CVU 958449). Los autores agradecen a la IBQ, Evelyn Godínez Hernández por su apoyo en la obtención eritrocitos humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76.
- Bradford, 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.
- Castillo-Villanueva, A., *et al.* 2007. Lectin from *Phaseolus acutifolius* var. escumite: chemical characterization, sugar specificity, and effect on human T-lymphocytes. *J Agric Food Chem*, 55(14), 5781-5787.

- González de Mejía (1990). The lectins and lectin-like proteins of tepary beans (*Phaseolus acutifolius*) and Tepary common bean (*Phaseolus vulgaris*) hybrids. *J Food Biochem*, 14, 117-126.
- Harouna., D. V. (2018). Under-exploited wild *Vigna* species potentials in human and animal nutrition: a review. *Global food security*. 18: 1-11.
- He, S. (2018). *Phaseolus vulgaris* lectins: A systematic review of characteristics and health implications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(1), 70-83.
- Jiang, B. 2019. Two-step isolation, purification, and characterization of lectin from zihua snap bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Polymers*, 11, 785.
- Lagunes-Espinoza, L. D. C. (2008). Diversidad cultivada y sistema de manejo de *Phaseolus vulgaris* y *Vigna unguiculata* en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Rev Chapingo Ser Horti*, 14(1), 13-21.
- Lis, H., & Sharon, N. (1986). Biological Properties of Lectins. In: The Lectins-Properties, Functions, and applications in Biology and Medicine, Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J. editors. New York: Academic Press.
- Mishra, A. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem Toxicol*, 134, 110827.
- Re, R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Ribeiro, A. C. (2018). Chapter 1-Plant Lectins: Bioactivities and Bioapplications. In: Studies in Natural Products Chemistry, Volume 58, Attaur-Rahman, editor. Elsevier, B. V.
- Sharma, A. (2009). Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi beans). *J Biomed Biotechnol*, 2009, 1-9.
- Sharon, N., & Lis, H. (2013). Lipids Carbohydrates Membranes and Membrane Proteins. Lectins. In: Encyclopedia of Biological Chemistry, Volume 2, Lennarz, W. J., & Lane, M. D., editors. 2nd ed. New York: Academic Press.
- Thompson, L. U., Tenebaum, A. V., & Hui, H. (1986). Effect of lectins and the mixing of proteins on rate of protein digestibility. *J Food Sci*, 51, 150-152.
- Valadez-Vega, C. (2011). Purification, biochemical characterization, and bioactive properties of a lectin purified from the seeds of white tepary bean (*Phaseolus acutifolius* variety latifolius). *Molecules*, 16, 2561-2582.
- Valadez-Vega, C. (2014). Cytotoxic and antiproliferative effect of tepary bean lectins on C33-A, MCF-7, SKNSH, and SW480 cell lines. *Molecules*, 19, 9610-9627.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2004). Biochemistry. 3rd edition. United States of America: Wiley International.